

**Állatorvostudományi Egyetem  
Állatorvostudományi Doktori Iskola**

**Magyarországról izolált PRRSV törzsek szekvencia  
elemzése és a PRRSV 7ap peptid biokémiai és  
immunológiai jellemzése**

Doktori értekezés

Olasz Ferenc

2017

Állatorvostudományi Egyetem

Állatorvostudományi Doktori Iskola

Témavezető és témabizottsági tag:

.....

**Dr. Zádori Zoltán**

Magyar Tudományos Akadémia, Agrártudományi Kutatóközpont,

Állatorvos-tudományi Intézet

témavezető

.....

**Dr. Bálint Ádám**

Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal

Állat-egészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság Budapest

témabizottsági tag

Készült 8 példányban. Ez a .... sz. példány.

.....

Olasz Ferenc

## Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke .....	5
2. Összefoglalás .....	7
3. Bevezetés .....	9
3.1 Célkitűzések .....	10
4. Irodalmi áttekintés .....	11
4.1 A vírus általános tulajdonságai.....	11
4.1.1 Rendszertan .....	11
4.1.2 A PRRS Magyarországon .....	13
4.1.3 Morfológia és genomszerveződés .....	15
4.1.4 Alternatív ORF-ek jelenléte az sg-mRNS-ekben .....	18
4.2 Kórfejlődés .....	19
4.3 A PRRSV és az immunrendszer kölcsönhatása.....	21
4.3.1 Társfertőzések .....	22
4.4 Gazdasági kártétel és vakcinázás .....	23
5. Anyag és módszer .....	26
5.1 Diagnosztikai vizsgálatok.....	26
5.2 Vírustörzsek eredete és a PCR templát előkészítése .....	26
5.3 PCR protokoll a virális genom fragmentek amplifikációjához .....	27
5.4 Újgenerációs szekvenálás.....	27
5.5 Filogenetikai törzsfa-rekonstrukció módszerei.....	29
5.5.1 PRRSV-2/Hungary/102/2012.....	29
5.5.2 9625/2012 törzs.....	30
5.6 A FLAG és GFP fúziós konstrukciók létrehozása .....	31
5.7 Az eGFP-N1 mutáció és ORF7a-GFP fúziós konstrukció .....	32
5.8 A 7ap fehérjék szintézise .....	32
5.9 Indirekt immunfluoreszcencia.....	34
5.10 Direkt ELISA .....	34
5.11 Indirekt ELISA .....	35
5.12 Komplementkötés gátlási próba .....	35
5.13 DNS és RNS gélretardációs teszt.....	36
5.14 Fehérje-fehérje gélretardációs teszt .....	37
5.15 Állatok immunizálása.....	37
5.16 Autoellenanyagok kimutatása indirekt immunfluoreszcenciával .....	38
6. Eredmények.....	39

<b>6.1</b>	<b>Magyarországi PRRSV minták teljes genom szekvenciájának elemzése .</b>	<b>39</b>
6.1.1	PRRSV 9625/2012 izolátum eredete és filogenetikai elemzése.....	39
6.1.2	PRRSV-2/Hungary/102/2012 törzs genomja és filogenetikai elemzése .....	43
<b>6.2</b>	<b>A PRRSV ORF7 alternatív leolvasási keretéről leíró peptidek immunológiai és biokémiai jellemzése .....</b>	<b>50</b>
6.2.1	Alternatív ORF-ek azonosítása a genomban .....	50
6.2.2	A 7ap transzlációja és lokalizációjának meghatározása fúziós konstrukciókkal .....	50
6.2.3	A 7ap IgG kötő képessége és a komplementkötés gátlása .....	53
6.2.4	A 7ap nukleinsav kötő tulajdonsága.....	56
6.2.5	Sejtmag elleni antitestek indukciója .....	57
<b>7.</b>	<b>Megbeszélés.....</b>	<b>60</b>
7.1	PRRSV 9625/2012 törzs jellemzése.....	60
7.2	PRRSV-2/Hungary/102/2012 törzs jellemzése .....	62
7.3	ORF7a-ról átíró fehérje jellemzése .....	65
<b>8.</b>	<b>Új tudományos eredmények .....</b>	<b>69</b>
<b>9.</b>	<b>Irodalomjegyzék.....</b>	<b>70</b>
<b>10.</b>	<b>A doktori kutatás eredményeiből született közlemények.....</b>	<b>87</b>
10.1	Lektorált tudományos folyóiratban megjelent publikációk.....	87
10.2	A doktori kutatás témájához szorosan nem kapcsolódó publikációk.....	87
<b>11.</b>	<b>Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>88</b>
<b>12.</b>	<b>Függelék.....</b>	<b>89</b>
12.1	ORF7a megőrzöttségének vizsgálatához felhasznált szekvenciák génbanki azonosító számai.....	89
12.2	9625/2012 filogenetikai vizsgálatához felhasznált szekvenciák génbanki azonosító számai.....	90
12.3	PRRSV-2/Hungary/102/2012 filogenetikai vizsgálatához felhasznált szekvenciák génbanki azonosító számai.....	91

## 1. Rövidítések jegyzéke

<b>A, T, G, C</b>	adenine, thymine, guanine, cytosine	adenin, timin, guanin, citozin
<b>ABTS</b>	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)	2,2'-azino-bisz-[3-etilbenzotiazolin-6-szulfonsav]
<b>ADE</b>	antibody-dependent enhancement	ellenanyag közvetítette erősítés
<b>AIP4</b>	atrophin-1 interacting protein 4	atrofin-1-gyel kölcsönható fehérje 4
<b>ANA</b>	anti-nuclear antibody	sejtmag ellenes antitestek
<b>AR</b>	antigenic region	antigénrégió
<b>ARFp</b>	alternate reading frame protein	alternatív leolvasási keret fehérje
<b>Arg</b>	arginine	arginin
<b>BSA</b>	bovine serum albumin	szarvasmarha szérum albumin
<b>cDNS</b>	complementary DNS	kiegészítő vagy komplementer DNS
<b>CH2, CH3</b>	constant heavy chain 2, 3	konstans nehéz lánc 2,3
<b>dNTP</b>	deoxynucleoside triphosphate	dezinukleotid-trifoszfát
<b>dsDNA</b>	double-stranded DNA	kétszálú DNS
<b>Ea</b>	antibody	ellenanyag
<b>eGFP</b>	enhanced green fluorescent protein	felerősített zöld fluoreszcens fehérje
<b>ELISA</b>	enzyme linked immunosorbent assay	enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálatok
<b>Fab</b>	fragment antigen-binding	antigénkötő rész
<b>Fc</b>	fragment crystallizable	kristályosítható darab
<b>g</b>	g-force	gravitációs erő
<b>GP</b>	glycoprotein	glikoprotein
<b>HCV</b>	Hepatitis C virus	hepatitis C vírus
<b>HHV</b>	human herpes virus	emberi herpeszvírus
<b>HP-PRRSV</b>	highly pathogenic PRRS virus	erősen patogén PRRS vírus
<b>IF</b>	immunofluorescence	immunfluoreszcencia
<b>IgG</b>	Immunoglobulin G	Immunglobulin G
<b>IL</b>	interleukin	interleukin
<b>INF</b>	interferon	interferon

<b>LP-PRRSV</b>	low pathogenic PRRS virus	gyengén patogén PRRS vírus
<b>MCMV</b>	maize chlorotic mottle virus	kukorica klorotikus foltosság vírusa
<b>MHC</b>	major histocompatibility complex	fő szövet-kompatibilitási komplex
<b>Mhp</b>	Mycoplasma hyopneumoniae	Mycoplasma hyopneumoniae
<b>MLV</b>	modified live virus	módosított élő vírus
<b>NA</b>	neutralizing antibodies.	neutralizáló ellenanyagok
<b>NNA</b>	non-neutralizing antibodies.	nem neutralizáló ellenanyagok
<b>nsp</b>	non-structural protein	nem szerkezeti fehérje
<b>ORF</b>	open reading frame	nyitott leolvasási keret
<b>PAM</b>	porcine alveolar macrophages	sertés alveoláris makrofágok
<b>PBMC</b>	peripheral blood mononuclear cell	perifériás mononukleáris sejtek
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline	foszfáttal pufferolt sóoldat
<b>PCBP2</b>	Poly(rC)-binding protein 2	poli-rC kötő fehérje
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction	polimeráz láncreakció
<b>PRDC</b>	porcine respiratory disease complex	sertés légzőszervi betegségkomplexe
<b>PRRSV</b>	porcine reproductive and respiratory syndrome virus	sertés reprodukciós és légzőszervi szindróma vírus
<b>RdRp</b>	RNA-dependent RNA-polymerase	RNS függő RNS polimeráz
<b>SARS</b>	severe acute respiratory syndrome	súlyos heveny légzőszervi szindróma
<b>SDS</b>	sodium dodecyl sulfate	nátrium-dodecil-szulfát
<b>sg-mRNS</b>	subgenomic messenger RNA	szubgenomiális hírvívő RNS
<b>spA</b>	Staphylococcus protein A	Staphylococcus A fehérje
<b>ssRNA</b>	single-stranded RNA	egyszálú RNS
<b>TM</b>	transmembrane	transzmembrán
<b>TNF</b>	tumor necrosis factor	tumor nekrozis faktor
<b>Tris</b>	tris(hydroxymethyl)aminomethane	trisz-(hidroximetil)-aminometán
<b>TRS</b>	transcription-regulating sequence	transzkripciót szabályzó szekvencia

## 2. Összefoglalás

Két olyan Magyarországról származó, sertés reprodukciós és légzőszervi szindróma vírus (PRRSV) izolátumon végeztünk teljes genomszekvencia-analízist, amelyekről feltételeztük, hogy különleges genetikai tulajdonságokkal rendelkezhetnek. Az egyik izolátum, a 9625/2012 közeli rokonságot mutat a PRRSV Olot/1991-gyel és egy Magyarországon is használt vakcina törzssel, az Amervac módosított, élő vírussal (MLV-vel). A vírus az 1-es genotípus 1-es szubtypusán belül a "D" kládba tartozik. A filogenetikai elemzések alapján a másik izolátum, a 2-es genotípusú PRRSV-2/Hungary/102/2012 az első olyan dokumentált, teljes hosszúságú PRRSV szekvencia Európában, amely nem áll közeli rokonságban az Ingelvac MLV-vel. A vizsgálatok egyik törzs genomjában sem azonosítottak rekombinációra utaló változást. A 9625/2012-ben a neutralizáló epitópokon talált nagyszámú aminosav változás az immunrendszer által gyakorolt erős szelektív nyomásra utal. Hasonló eredményre jutottunk a PRRSV-2/Hungary/102/2012 esetében is, az aminosav cserék többsége a GP4 (glikoprotein 4) és GP5 fehérje ismert antigénrégióiban lokalizálódik, emiatt feltételezhető az immunválasz szerepe a törzs evolúciójában.

Egy rövid, alternatív, nyitott leolvasási keret (ORF) jelenlétét azonosítottuk egymástól genetikailag eltérő PRRSV törzsek nukleokapszid génjében. Ezt a rövid ORF-et, ORF7a-nak nevezzük. Az ORF7a génről átíródó potenciális fehérjetermékek (7ap-k) a különböző vírustörzsekben eltérő fizikai-kémiai tulajdonságokat mutatnak, azonban az összesre jellemző, hogy semleges pH-n pozitív töltéssel rendelkeznek a bázikus aminosavak túlsúlya miatt. Zöld fluoreszcens fehérje (eGFP) és FLAG fúziós konstrukciókkal bizonyítottuk a HU-14432/2011 törzsből a 7ap fehérje (Hu7ap) transzlációját. ELISA teszttel kimutattuk a Hu7ap peptid IgG (immunglobulin G) kötő tulajdonságát. A fehérje-fehérje gél retardációs és komplementkötés gátlási próba eredményei arra utalnak, hogy a 7ap fehérje az IgG Fc (kristályosítható rész) részén található CH2 (konstans nehéz 2) doménhez kötődik. A nukleinsav gél retardációs tesztekben, két eltérő PRRSV törzsből származó 7ap is erős kétszálú DNS és egyszálú RNS kötést mutatott. Ez arra utal, hogy a 7ap nukleinsav kötő képessége a peptid funkciójának a következménye, és nem csak a pozitív töltéséből eredő járulékos tulajdonság. A Hu7ap-val immunizált állatok (egér és sertés) savója nem reagált Hu7ap-val vagy a Hu7ap-eGFP fehérjével, ám ezen állatok vérsavójában észleltük a sejtmag ellen termelődött antitestek jelenlétét. A 7ap sejtbeli elhelyezkedése, biokémiai és immunológiai tulajdonságai azt mutatják, hogy többféle funkciót is elláthat, szerepe lehet az immunválaszban és a sejtmagban valamint a citoplazmában zajló folyamatok módosításában.

## 2.1 Summary

Whole genome sequencing was performed on biologically relevant porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates. Two virus strains were selected that were hypothesized to have special genetic features. The PRRSV 9625/2012 isolate was closely related to PRRSV Olot/1991 and to the Amervac live, attenuated vaccine (MLV) which is widely used in Hungary. The isolate belonged to a new branch within genotype 1, subtype 1, clade D. The other completely sequenced strain, the PRRSV-2/Hungary/102/2012, was the first documented type 2 PRRSV isolate in Europe that was not related to the Ingelvac MLV. The recombination analysis of these two isolates revealed no evidence of such event. The PRRSV 9625/2012 isolate did show a high proportion of amino acid substitutions in the neutralizing epitopes, suggesting an important role of selective immune pressure in the evolution of the isolate. The majority of amino acid alterations in GP4 and GP5 of the PRRSV-2/Hungary/102/2012 were located in the known antigenic regions suggesting an important role for immunological pressure.

Analysis of sequentially divergent PRRSV genomes identified a short alternative open reading frame (ORF) named ORF7a within the nucleocapsid gene. Alignment of the corresponding protein sequences (named 7ap) revealed substantial heterogeneity among 7aps of different genotypes though all of them were predicted to be positively charged. Green fluorescent protein and FLAG fusion constructs of ORF7a of the HU-14432/2011 PRRSV demonstrated that 7ap (Hu7ap) are expressed. The ELISA experiments revealed that Hu7ap binds strongly to mammalian IgGs. Protein-protein gel retardation assays and complement fixation inhibition suggest that 7aps binds to the CH2 domain of the IgG Fc fragment. 7aps of divergent strains were able to completely reduce the motility of nucleic acids at relatively high molar charge ratios in gel retardation assays indicating strong dsDNA- and ssRNA-binding capability. The RNA- and DNA-binding properties suggest that nucleic acid binding is a functional property of 7aps, and not an arbitrary consequence of their net positive charge. Hu7ap immunized pig and mouse sera didn't react with Hu7ap or Hu7ap-GFP, however, antinuclear antibodies were detected in the sera of immunized animals suggesting an ability of Hu7ap to interact with or mimic auto-antigenic macromolecules. Cellular localization, biochemical and immunological characteristics of PRRSV 7ap may indicate multiple functions including nuclear and cytoplasmic over-tuning of normal cellular processes and immunosuppression.



### 3. Bevezetés

A sertések reprodukciós és légzőszervi szindrómáját (PRRS) először az USA-ban észlelték az 1980-as évek legvégén, mint egy ismeretlen új betegséget, amely súlyos szaporodási problémákat, légzőszervi megbetegedést, a malacok fejlődésbeli visszamaradását és megnövekedett mortalitást okoz (Keffaber 1989; Loula 1991). Végül 1992-ben sikerült azonosítani a kórokozót, amelynek első izolátumát VR-2332-nek nevezték el (Collins et al., 1992). Néhány évvel később egy hasonló betegséget és vírust írtak le Európában (Terpstra et al., 1991). A vizsgálatok kiderítették, hogy az európai és az észak-amerikai törzs ugyanannak a vírusnak genetikailag eltérő rokon változata.

A PRRS megjelenése után az egyik legnagyobb gazdasági károkat okozó fertőző betegséggé vált a sertéságazatban (Holtkamp et al., 2013; Kristensen, 2012; Nieuwenhuis et al., 2012). Habár kereskedelmi forgalomban PRRSV fertőzés ellen többféle vakcina is elérhető, a kutatóintézetek és a vakcinagyártók erőfeszítései ellenére továbbra sincs forgalomban olyan védőoltás, amely képes lenne teljes mértékű védelmet nyújtani a fertőzés ellen, legyen az inaktivált vírus vagy módosított élő vírus (MLV) alapú vakcina. A hatékony vakcina kifejlesztését több tényező is hátráltatja. Egyik legnagyobb probléma a vírus nagyfokú genetikai diverzitása, amely szélsőséges antigén változékonyságot eredményez (Charentantanakul, 2012). Két törzs genom szekvenciája között akár 45% eltérés is lehetséges. Egy másik probléma az, hogy a virulenciát és a patogenitást befolyásoló genom szakaszok helyzete és működése egyelőre nem teljesen tisztázott. A vírus gyenge immunválaszt vált ki a fertőzött állatokból, mert számos, immunszuppresszív hatású fehérjével rendelkezik (Mateu és Diaz, 2008). A PRRSV genomjára jellemző, hogy ugyanaz a szekvencia akár több fehérjét is kódolhat. Az utóbbi években több olyan nyitott leolvasási keretet (ORF-et) fedeztek fel, amelyek ismert ORF-ekkel fednek át. A közelmúltban felfedezett fehérjék patogenezisben betöltött szerepe még nem teljesen ismert (Firth et al., 2011; Oh és Lee, 2012; Wu et al., 2001).

Magyarországon a fertőzés az 1990-es évek közepén jelent meg, de csak a 2000-es évektől okozott komoly problémákat. Egyes nagy létszámú sertés állományokban a fertőzöttség mértéke elérheti a 25-35%-ot is. Magyarországon az évek során genetikailag és virulenciáját tekintve is a nyugat-európai országoknál heterogénebb PRRSV populáció alakult ki, amelyek között európai, és észak-amerikai genotípusú törzsek is megtalálhatóak (Balka et al., 2008). A komoly gazdasági károk következtében 2010-ben Magyarországon elfogadták a Nemzeti PRRS Mentésési Programot. A program célja a magyar sertésstartás versenyképesebbé tétele és piaci előnyök biztosítása a hazai gazdák számára.

### 3.1 Célkitűzések

A PRRS mentesítési program elősegítése érdekében részt vettünk a magyarországi PRRSV törzsek genetikai diverzitásának felmérésében. Célul tűztük ki olyan PRRSV izolátumok teljes genomszekvenciájának meghatározását, amelyekről azt feltételeztük, hogy egyedi genetikai tulajdonságokkal rendelkezhetnek. Két vírustörzset választottunk ki: az egyik izolátum egy nem vakcinázott, a járvány kitörése előtt PRRS mentes telepről származott. A másik mintát egy PRRSV-vel endémiásan fertőzött, rendszeresen vakcinázott telepről izolálták. A két izolátumot érő szelekciós hatásokat kívántuk tanulmányozni, ezért a származtatott aminosav szekvenciákat referenciatörzsekkel hasonlítottuk össze, hogy feltérképezzük a szerkezeti fehérjék antigénrégiójában található mutációkat.

A vírus genomjára jellemző, hogy ugyanaz a szekvencia akár több fehérjét is kódolhat. A kutatásunk kezdetéig két szubgenomiális hírvívő RNS-nél (sg-mRNS-nél) figyelték meg azt, hogy egy szekvenciáról két fehérje íródik át. Célkitűzéseink között szerepelt a rendkívül gyorsan mutálódó PRRSV genomjának elemzése és új, eddig ismeretlen ORF-ek azonosítása, majd ezek további vizsgálata. Munkánk során bizonyítani kívántuk, hogy a vírusfertőzés során az alternatív ORF-ekről fehérje fejeződik ki, és célul tűztük ki a termelődött fehérje biológiai tulajdonságainak és funkciójának megismerését. Ennek érdekében a feltételezett ORF-eket kezdetben zöld fluoreszcens fehérje (eGFP) fúziós rendszerben vizsgáltuk. Mivel az eGFP-t kódoló szakasz mintegy 708 nukleotid hosszúságú, méreténél fogva befolyásolhatja az átíródó mRNS térszerkezetét, hiszen a vizsgálandó ORF-ek mindössze 105-159 nukleotid hosszúságúak. Hogy elkerüljük az ebből adódó téves következtetéseket, a kapott eredményeket FLAG fúziós peptid alapú konstrukciók létrehozásával ellenőriztük. Immunológiai tesztekkel tanulmányoztuk a 7ap fehérje antigenitását PRRSV fertőzésen átesett vagy immunizált sertések vérének felhasználásával. Fogékony sejtvonalat fertőztünk PRRSV-vel, és kísérleti állatokban 7ap ellen termelődött ellenanyagok segítségével vizsgáltuk a fehérje sejten belüli lokalizálódását és biológiai tulajdonságait.

## 4. Irodalmi áttekintés

### 4.1 A vírus általános tulajdonságai

Az 1980-es évek végén az Egyesült Államokban egy addig ismeretlen fertőző betegség bukkant fel, amely rövid időn belül komoly károkat okozott a sertésállományokban (Kaffaber, 1989; Loula, 1991). Ezzel egy időben Európában egy nagyon hasonló betegséget figyeltek meg, amelyet kezdetben – a tünetek miatt – Hollandiában kék abortusznak (abortus blauw) míg Angliában kékfül betegségnek (blue ear disease) (Wensvoort et al., 1991) neveztek. Az okozott kórképre jellemző volt a légzőszervi károsodás miatt a fiatalabb állatokban a fülön megjelenő cianózis, amely mellé testtömegvesztés és a növekedés lelassulása társult. Kocáknál a szaporodásbiológiai problémák kerültek előtérbe, amelyek a koraellések és vetélések számának emelkedésében mutatkoztak meg. A betegség kórokozóját Európában először 1992-ben a Lelystadi Központi Állatorvosi Intézetben (Central Veterinary Institute in Lelystad) izolálták és azonosították, a vírustörzset pedig a városról Lelystadnak nevezték el. A fertőzést először úgy emlegették, mint „swine infertility and respiratory syndrome” (SIRS), ám neve végül hivatalosan a sertés reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómája (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome vagy PRRS) lett. A vizsgálatok kiderítették, hogy az európai és az észak-amerikai izolátumok (VR-2332 és Lelystad) ugyanannak a vírusnak genetikailag eltérő rokon változata. Habár a PRRSV nagyobb kártétele miatt csak az 1990-es évek elején keltette fel az állatorvosi társadalom komolyabb érdeklődését, retrospektív vizsgálatokból úgy tűnik, hogy korábban is jelen lehetett a világ sertésállományaiban. A vírus elleni antitesteket sikerült kimutatni 1978-ból származó kanadai és 1985-ből származó egyesült államokbeli és dél-koreai savómintákból is (Zimmerman, 2003).

#### 4.1.1 Rendszertan

A PRRSV pozitív, egyszálú RNS genommal rendelkezik. A *Nidovirales* rend *Arteriviridae* családjába soroljuk. A család *Arterivirus* nemzetségébe négy faj, a ló arteritis vírus (EAV), a majmok vérzéses láz vírusa (SHFV), az egér arterivírus (LDV), és a PRRSV tartozik (Snijder és Meulenberg, 1998).

A PRRSV fajon belül a vírusok két, egymástól jól elkülönülő genotípusba sorolhatók, amelyek nukleotidszinten mindössze kb. 60% hasonlóságot mutatnak egymással. Az egyiket 1-es vagy európai típusnak, a másikat 2-es vagy amerikai típusnak nevezzük. A genotípusok közti genetikai eltérés magyarázatára két elmélet

született. Az első, hogy a két arterivírus egyidőben váltott gazdafajt Európában és Észak-Amerikában. A másik hipotézis, hogy csak egy gazdafaj váltás történt, és a két genotípus kialakulását a PRRSV szekvenciájának gyors változása eredményezte. A filogenetikai vizsgálatok az előbbi elméletet támogatják, mivel az elemzések szerint a két genotípus legközelebbi közös őse legalább száz évvel ezelőtt létezett (Shi et al., 2010a). Az elnevezések az eredeti izolálási helyekre utalnak, azonban az elmúlt huszonöt évben a különböző genotípusba tartozó vírusok eredeti kontinensük határain jóval túl is felbukkantak. Így az 1-es genotípusú vírusokat nem csak Európából, hanem legalább öt Európán kívüli országból (USA, Dél-Korea, Thaiföld, Kína és Kanada) is leírták már (Murtaugh et al., 2010; Shi et al., 2010a; Thanawongnuwech et al., 2004). A filogenetikai vizsgálatok nagy változatosságot tártak fel az Európában honos törzsek között is; az eredmények alapján legalább három szubtípusba lehet sorolni a genotípus jelenleg ismert tagjait. Az 1-es szubtípust legalább tizenkettő kládra tudjuk továbbosztani. A legkorábbi izolátumok, így maga a Lelystad törzs is az „A” kládba tartozik. Ebbe a csoportba tartozó törzseket nemcsak Európából, hanem Thaiföldről és az USA-ból is izolálták már. Léteznek azonban olyan kládok is, amelyeknek tagjait csak egy bizonyos országból azonosították, ilyen például az Olaszországból kimutatott „L” klád (Shi et al., 2010a). A Kelet-Európában talált 2-es és 3-as szubtípusú törzsek jelentősen eltérnek a nyugat-európaiaktól, így jelenleg azt feltételezik, hogy Kelet-Európában már akkor különféle PRRSV törzsek cirkuláltak, mielőtt az 1-es szubtípus megjelent Nyugat-Európában (Nauwynck et al., 2014; Stadejek et al., 2006). A nagyfokú változatosságból arra lehet következtetni, hogy a vírus már az 1990-es évek előtt is jelen lehetett mind Kelet-, mind Nyugat-Európában, ám akkor még nem okozott nagyobb járványt, és a betegség tüneteit valószínűleg ismeretlen eredetű vetélésnek és légzőszervi kórképnek tudhatták be. A filogenetikai elemzések alapján az 1-es szubtípus kládjai nem a legkorábban felfedezett „A” kládba tartozó Lelystad törzsből vagy rokonaiból alakultak ki, a diverzifikálódásuk már azelőtt megtörténhetett, mielőtt az először felfedezett vírusok járványokat okoztak (Nauwynck et al., 2014; Stadejek et al., 2006).

A 2-es genotípus sem csak Észak-Amerikában fordul elő, hanem a világon mindenütt; izolálták őket Európa több országából, Dél-Amerikából és távol-keleti országokból is. A filogenetikai összehasonlító vizsgálatok kilenc leszármazási vonalat (röviden vonalat vagy angol nevén lineage-t) különítenek el a genotípuson belül. A legrégebbi minták Kanadából származnak, így elképzelhető, hogy itt jelent meg először a 2-es genotípus (Shi et al., 2010a). A kilenc vonalból hét főleg Észak-Amerikában terjedt el, de az utóbbi években Amerikán kívül is izolálták őket. A másik két vonalat csak Ázsiában, helyi járványokból diagnosztizálták. A legnagyobb elterjedtséget az 5-ös vonal mutatja, az észak-amerikai országokon kívül nyolc más államban is kimutatták

(Murtaugh et al., 2010; Shi et al., 2010a; Thanawongnuwech et al., 2004). Kínában először 1996-ban igazolták a PRRSV jelenlétét, és bár jó ideig nem okozott nagyobb járványokat az országban, 2006-ban egy erősen patogén, atípusos formája jelent meg. Az általa okozott járvány több mint kétmillió állatot érintett, és a mortalitási ráta elérte a 20%-ot. A járvány a kifejtett állatokban is elhullásokhoz vezetett, ez pedig a korábbi PRRSV kitörésekre nem volt jellemző. A betegség tünetei 3-5 napon belül megjelentek a teljes állományban, ami jól mutatta az új törzs erős virulenciáját (Song et al., 2010; Tian et al., 2007).

Az 1-es és 2-es genotípus között *in vitro* gyakran figyeltek meg rekombinációt, és a sertésállományokból izolált mintákban is többször találtak rekombináns törzseket. (Shi et al., 2010b). Az újabb tanulmányok eredménye szerint a rekombináció a PRRSV-k között gyakori jelenség. Legalább 11 darab olyan pontot találtak az 1-es genotípus esetén, és legalább 8 pontot a 2-es genotípusban, ahol rekombináció történhet. Ezek a helyek nem strukturális és strukturális fehérjéket is érintenek (Martín-Valls et al., 2014).

A kocákat érintő, vemhesség alatti fertőzésekben a két genotípus között a tüneteket tekintve nincsen észlelhető különbség (Han et al., 2014). A fiatalabb állatokban a légúti fertőzéseknel azonban az okozott kórképek között eltérés figyelhető meg. A 2-es típusú vírusok általában komolyabb légzőszervi tüneteket okoznak, mint az 1-es típusúak, annak ellenére, hogy a különbségek a szisztémás klinikai tünetekben csak ritkán jelennek meg (Han et al., 2013; Martínez-Lobo et al., 2011). A légzőszervi tünetekben tapasztalt eltérés egyik oka az lehet, hogy a 2-es típusú törzsek sejttropizmusa különbözik az 1-es típusúaktól. Az utóbbiak főleg az alsó légutakban szaporodnak hatékonyan, míg a 2-es típusúak képesek magas vírus titert elérni a felső légutakban is. Ez a különbség hozzájárulhat a 2-es típusú törzsek magasabb patogenitásához és virulenciájához, és könnyíti a levegő útján terjedő fertőzést is (Nauwynck et al., 2014). A nyugat-európai törzsek (1-es genotípus 1-es szubtípus) által okozott fertőzések főleg szaporodási zavarokban mutatkoznak meg. Meg kell azonban jegyezni, hogy ezektől eltérő, szintén szélesebb sejttropizmussal rendelkező kelet-európai 2-es és 3-as szubtípusok legalább olyan komoly légúti tüneteket okozhatnak, mint a 2-es típusú törzsek (Frydas et al., 2013; Nauwynck et al., 2014).

#### **4.1.2 A PRRS Magyarországon**

Hazánkban a betegséget 1995-ben állapították meg először (Hornyák et al., 1996), amelynek nyomán az állategészségügyi szakvezetés a PRRS-t bejelentési kötelezettség alá vonta, a 41/1997 FM rendelet pedig meghatározta a PRRS elleni hatósági intézkedéseket. Az 1997-ben elrendelt országos felmérő vizsgálat a

tenyészállományok kb. 15%-os fertőzöttségét mutatta ki, hazánk teljes sertésállományára vetítve pedig a fertőzöttség 5% alatti volt.

Az alacsony fertőzöttségi szint és az alkalmazott hatósági intézkedések (bejelentési kötelezettség, állományok PRRS-minősítése, tenyésztelepek hármas mentességének négyes mentességgé való kiszélesítése, forgalmi korlátozások és rendszeres ellenőrző vizsgálatok) hozzájárultak ahhoz, hogy hazánk európai uniós csatlakozása előtt a nagylétszámú állományok fertőzöttsége 2%-ra csökkenjen, ami megfelelő alapokat biztosított volna egy sokak által támogatott országos mentesítési program végrehajtásához.

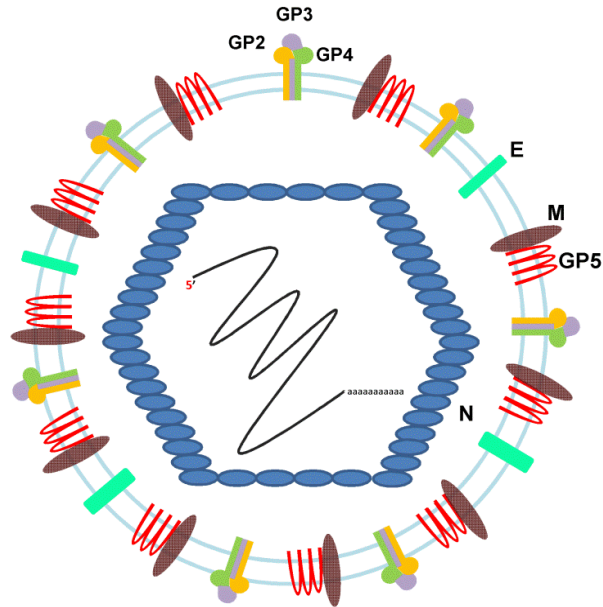
Ennek ellenére, a különleges elbírálás lehetőségét feladva, az európai uniós jogharmonizációnak megfelelően a PRRS törlésre került a bejelentési kötelezettség alá tartozó fertőző betegségek listájáról, valamint 2002-ben hatályukat veszítették a 41/1997 FM rendelet PRRS-re vonatkozó részei. Egyedül a tenyészanyag import feltételeként maradt meg a négyes mentesség deklarálása. Ezek a jogszabályi változások, az unión belüli egyszerűsített állatforgalom alapján történő PRRSV-vel fertőzött hízó alapanyag import, valamint a vakcinák hatósági intézkedések nélkül végzett alkalmazása ahhoz vezetett, hogy a PRRS fertőzöttség a 2000-es évek közepére a nagylétszámú állományokban elérte a 20–25%-ot (Balka, 2009) valamint genetikailag és virulenciáját tekintve is rendkívül heterogén PRRSV populáció alakult ki. Az 1-es (korábban európai) genotípus legalább 7 kládjá, valamint a 2-es genotípus két genetikai vonala is megjelent hazánkban, a klinikai tünetek pedig a tünetmentestől a súlyos szaporodásbiológiai és légzőszervi kórképekig terjedtek (Balka et al., 2008). Jelenleg, a nagylétszámú állományokban a fertőzöttség mértéke eléri a 25–35%-ot. A tenyészállományok 15%-a fertőzött, azonban a hazai kocaállomány 40%-a ezeken a fertőzött telepeken él (Szabó et al., 2014).

A komoly gazdasági károk következtében a PRRS 2005-ben visszakerült a bejelentési kötelezettség alá tartozó fertőző betegségek listájára, 2008-ban pedig a betegség elleni védekezés végrehajtásának szabályozásáról miniszteri rendelet döntött, amely 2014-ben lépett hatályba (3/2014 (I.16) VM rendelet). A PRRS rendelet az Európai Unió jóváhagyását követően 2016. március 18-án módosításra került. Ennek megfelelően a 2010-ben bejelentésre került Nemzeti PRRS Mentésítési Program az EU által is elfogadott jogszabályi alapokon folyik Magyarországon. Célja a magyar sertéstartás versenyképesebbé tétele, és piaci előnyök biztosítása a hazai gazdák számára. A PRRS mentesség révén új exportpiacok nyílhatnak meg, a csökkenő gyógyszerfelhasználás révén pedig a hízósertések nevelése költséghatékonyabbá válhat. A regionális alapokon szervezett mentesítési program 2014-ben kezdődött, majd fokozatosan, 2017-ig kerül kiterjesztésre az ország egész területén, és 2020-ra hazánk

a betegségtől remélhetőleg mentessé válik. Ennek eredményeként Magyarország kilenc megyéje (Baranya, Tolna, Pest, Fejér, Zala, Vas, Nógrád, Heves és Borsod-Abaúj-Zemplén) már teljesen mentesült a betegségtől, Somogy megyében kettő, Szabolcs-Szatmár-Bereg megyében pedig csak egy állomány fertőzött (Dr. Bálint Ádám (NÉBIH ÁDI) személyes közlése alapján). 2017. november 1-ig a fennmaradó megyéket (Komárom-Esztergom, Hajdú-Bihar, Győr-Moson-Sopron, Veszprém, Békés, Csongrád, Bács-Kiskun, Jász-Nagykun-Szolnok) is bevonják a mentesítési programba. A sertésállományok PRRSV-től való mentesítésére többféle módszer alkalmazható. Az egyik a teljes állomány cseréje, amely ugyan költséges megoldás, de a visszafertőződés veszélye így a legkisebb. Az eljárás során az összes állatot eltávolítják a telepről, és egy alapos takarítás, fertőtlenítés után egy igazoltan negatív állományból hoznak új állatokat. Egy másik lehetőség az állományban élő állatok folyamatos tesztelése, és a diagnosztikai vizsgálatban pozitív eredményt adó állatok eltávolítása. Ezt a módszert főleg tenyészállományoknál alkalmazzák. Elsősorban alacsony kocalétszám és megfelelő épületekkel, férőhelyekkel rendelkező telep esetén szóba jön még a "roll over" módszer. Az eljárás lényege, hogy az első lépésben PRRSV-re szeropozitív és fertőzött kocákból létrehoznak egy állományt. Ez legegyszerűbben az állatok MLV-vel történő vakcinázásával érhető el. A pozitív tenyészkoça-állományra legalább hat hónapig zárlatot rendelnek el. Ez idő alatt az összes állat szeropozitívvá válik, és a vírus eltűnik az állományból. Ennek ellenőrzése céljából a zárlat feloldása előtt két héttel fogékony sertéseket, úgynevezett őrszem állatokat hoznak be és folyamatosan vizsgálják őket. Ha a szeronegativitásuk megmarad, akkor a zárlat feloldható, és az új, szeronegatív előhasi kocákat be lehet állítani a szeropozitív, immunis kocák közé. Az állományban a szeropozitív állatokat folyamatosan selejtezik, és az újonnan született malacok közül kiválasztott kocasüldőkkel helyettesítik őket. A felsorolt módszerek mind megfelelő hatékonysággal működhetnek, és hogy melyik kerül alkalmazásra, az adott telep jellegétől és méretétől függ. Egy telep akkor nyilvánítható PRRS mentessé, ha az elmúlt 3 évben minden vizsgálati eredmény negatívnak bizonyult. (Szabó et al., 2014).

### **4.1.3 Morfológia és genomszerveződés**

A PRRSV pozitív irányítottságú, egyszálú RNS genommal (+ssRNS) rendelkező burkos vírus. A virion 50–74 nm nagyságú, kerek vagy tojásdad alakú, egy külső 4,5 nm széles lipid kettősréteg (burok) fedi, amely a szerkezeti fehérjéket tartalmazza (például GP4 és GP5). A víruson belül található egy körülbelül 39 nm átmérőjű, belső (ún. core) régió, mely a nukleokapszid fehérjéből (N fehérje) és a vírus genomjából áll (Dokland, 2010) (1. ábra).



**1. ábra:** A virion sematikus szerkezete. Kék színű ellipszisek jelölik a nukleokapszidot alkotó N fehérjét. A nukleokapszidon belül található az egyszálú, 15 kb hosszúságú RNS genom. A nukleokapszidot kettős lipidréteg veszi körül, amelyben a GP2 (sárga színnel jelölve), GP3 (halványlila színnel) és GP4 (zöld színnel) alkotta trimer, az E fehérje (türkiz), valamint az M (barna) és GP5 (piros) alkotta dimer fehérjék találhatóak.

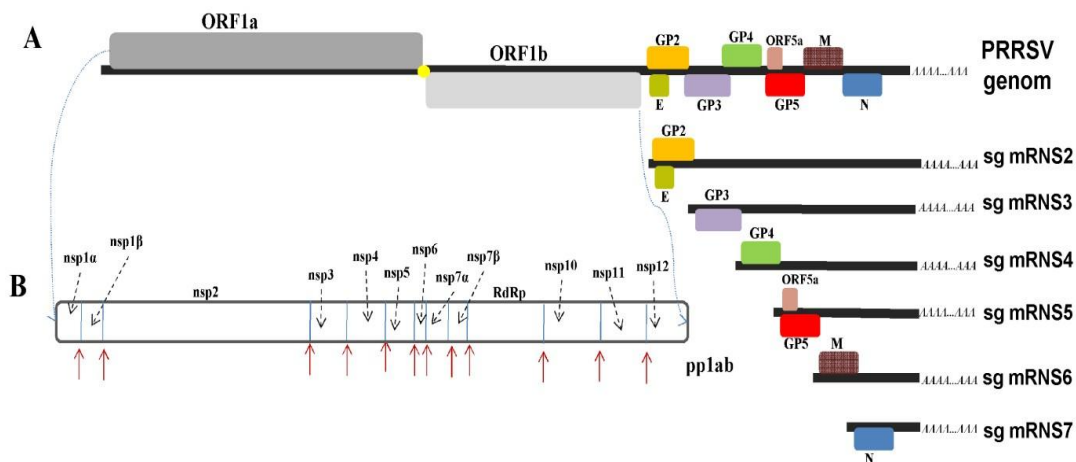
A genom körülbelül 15000 bázispár méretű, policisztronos, két nagy nyitott leolvasási keretet (ORF-et), továbbá legalább nyolc, kisebb méretű ORF-et tartalmaz, amelyekről a replikációhoz szükséges nem szerkezeti fehérjék (nsp), illetve szerkezeti fehérjék íródnak át (Meulenberg, 2000). A vírus gazdasejtbe való bejutása után a citoplazmában először az első két ORF-ről (ORF1a és ORF1b) íródik át két nagyméretű fehérje, a poliprotein 1a (pp1a) és a poliprotein 1ab (pp1ab). Az utóbbi fehérje keletkezéséhez szükséges egy riboszomális frameshift, azaz mRNS transzlációja során a leolvasási keret elcsúszik a szekvencia egy adott pontján, az ORF1a és ORF1b között (Dokland, 2010; Fang és Snijder, 2010). A létrejövő poliproteinekről kezdetben autoproteolízissel lehasad az nsp1 $\alpha/\beta$  és az nsp2, amelyek később kihatják a fő proteázt, az nsp4-et, amely befejezi a poliprotein feldarabolását. Ezidáig 16 darab fehérjeterméket ismerünk (Dokland, 2010; Fang és Snijder, 2010). Az nsp3-ról megerősítést nyert, hogy az arterivírusokra jellemző kettős membránú vezikulák formálásában játszik jelentős szerepet, amelyekben a vírus replikációs és transzkripció komplex (RTC) helyezkedik el. Az nsp3 által kialakított, citoplazmától elhatárolt mikro környezetben folyó transzkripció és genom replikáció megnehezíti a természetes



immunrendszer nukleinsav receptorai számára a vírus RNS-ek felismerését és a megfelelő immunválasz kiváltását (Posthuma et al., 2008). Több nem szerkezeti fehérjéről ismert, hogy a fertőzés korai fázisában gátolják a természetes immunválaszt. Az nsp1 $\alpha/\beta$  és nsp2-ről például kimutatták, hogy nemcsak poliproteinek érésében játszanak fontos szerepet, hanem interferon gátlóként is viselkednek (Chen et al., 2010; Rascón-Castelo et al., 2015; Sun et al., 2010). Az egyik legfontosabb nem szerkezeti fehérje az nsp9, mely egy RNS-függő RNS-polimeráz (RdRp) és a vírus replikációjának elengedhetetlen enzime (Fang és Snijder, 2010; Lunney et al., 2016).

A *Nidovirales* rendbe tartozó vírusokra jellemző, hogy a szerkezeti fehérjéket kódoló ORF-ekről (ORF2-7) nem-folytonos átíródással, eltérő méretű negatív szálú RNS-ek halmaza képződik, amelyeket szubgenomiális (sg) RNS-zettnek nevezünk. Ezekről a negatív szálú sg RNS-ekről írónak át a pozitív szálú sg-mRNS-ek a következő lépésben. A PRRSV genomjáról összesen hat sg-mRNS keletkezik, ezekről fordítódnak le egyesével a szerkezeti fehérjék (Marle et al., 1999; Snijder és Meulenberg, 1998). Az sg-mRNS 2-ről és az sg-mRNS 5-ről azonban ismert, hogy ezekről nem egy, hanem legalább két fehérje íródik át. A 2.-tól 6.-ik ORF-ek által kódolt fehérjék a burokbán helyezkednek el. Az ORF2-ről a glikozilált GP2 íródik le, ORF3-ról a GP3, ORF4-ről a GP4, ORF5-ről a GP5, és az ORF6-ról a nem glikozilált membrán (M) fehérje (2. ábra). Az M és GP5 fehérje egy heterodimert alkot, amelyet egy diszulfid-híd köt össze, és ez a komplex alkotja a virion fehérjéinek felét (Dokland, 2010). A dimernek a gazdasejtbe való bejutásban van fontos szerepe, komplex alacsony affinitással tapad a sejtfelszíni fehérjékhez kapcsolt heparán-szulfát poliszacharidhoz. Bár ez a kötődés nem létfontosságú a fertőzéshez, nagy valószínűséggel elősegíti a vírus sejtfelszíni tapadását (Breedam et al., 2010). A másik három glikoprotein, a GP2, a GP3 és a GP4 egy heterotrimert alkot, fő feladatuk a CD163 sejtfelszíni receptor felismerése, és a sejtbe való bejutás elősegítése (Dokland, 2010). A lehetséges receptorok (heparán-szulfát, vimentin, CD151, CD209, szialoadhezin és CD163) közül egyértelműen a CD163 tűnik a fő és meghatározó receptornak, amely főleg az alveoláris makrofágokban expresszálódik. Whitworth és mtsai CRISPR-Cas9 rendszert használva működésképtelenné tették a receptort, és a CD163<sup>-/-</sup> malacok védettnek bizonyultak a PRRS fertőzéssel szemben (Breedam et al., 2010; Withworth et al., 2016). A GP2, GP3, GP4, GP5 ellen neutralizáló hatású ellenanyagok képződnek a fertőzésen átesett sertésekben (Vanhee et al., 2011). Ha a GP5 fehérjén a glikozilációs helyeken mutáció történik, a mutáns, hipoglikozilált GP5 fehérjével rendelkező vírus ellen sokkal nagyobb mennyiségű neutralizáló ellenanyag képződik, mint egy vad vírus ellen. Feltételezhetően a GP5 glikozilációja fontos szerepet játszhat abban, hogy a

neutralizáló hatású ellenanyagok késleltetve termelődnek (Ansari et al., 2006; Faaberg et al., 2006).



**2. ábra:** (A) PRRSV genomszerveződése. A genomról összesen hat darab szubgenomiális (sg) mRNS (sg-mRNS 2-7) keletkezik, amelyekről a vírus szerkezeti fehérjéi íródnak át (a kódoló régiók színes téglalapokkal jelölve). (B) Az ORF1a és az ORF1b gén terméke (szürke téglalapok) a teljes genomról fordítódik le. A pp1ab fehérje (fehér téglalap) keletkezését egy riboszomális frameshifttel teszi lehetővé, amely az ORF1a és az ORF1b között (a frameshift helyét egy sárga pont jelöli) található. A keletkező poliprotein enzimatisz emésztés után (a hasítóhelyek piros nyilakkal jelölve) nem szerkezeti fehérjékre (nsp-k) hasad. Az nsp9 az RNS-dependens RNS-polimeráz (RdRp).

#### 4.1.4 Alternatív ORF-ek jelenléte az sg-mRNS-ekben

Több vírusfajnál ismert, hogy ORF-jeik átfedésben lehetnek egymással (Chirico et al., 2010). A szerkezeti fehérjéket kódoló ORF-ek egy része részben átfed egymással, továbbá több olyan ORF-et is találtak, amely teljes mértékben egy másik ORF-ben helyezkedik el. A PRRSV-ben egy adott szekvencia akár több fehérjét is kódolhat. Az első átfedő ORF-et PRRSV-ben 2001-ben írták le. Akkor az sg-mRNS 2-ről fedezték fel, hogy nem csak a GP2 fehérje transzlálódik róla, hanem egy kisebb 10 kDa-os fehérje is, melyet később envelop (E) proteinnek neveztek el (Wu et al., 2001). A legfrissebb kutatások azt mutatják, hogy az sg-mRNS 5 is két fehérjét kódol, az egyik a kanonikus GP5 fehérje, a másik ORF5a-nak nevezett rövid, a vírustörzstől függően 43-64 aminosav méretű peptid (Firth et al., 2011; Oh és Lee, 2012). Ezeknek a keletkezését valószínűleg a „leaky scanning” mechanizmus teszi lehetővé, ami azt jelenti, hogy a transzláció nem

minden esetben kezdődik az első AUG kodonnal, hanem az esetek bizonyos százalékában a riboszóma átsiklik ezen, és a következő start kodont ismeri fel mint iniciációs szignált. Ez általában akkor történhet meg, amikor az első start kodon környezete nem optimális, vagyis +4 pozícióban nem guanin és -3 pozícióban nem adenin vagy guanin található (Firth és Brierley, 2012). Fang és munkatársai 2012-ben az ORF1a génen felfedeztek egy +1-es riboszómális frameshift pozíciót, amely egy csonka pp1a fehérje képződését eredményezte. A proteolitikus hasítás után egy módosult nsp2 jött létre, ezt nsp2TF-nek nevezték el. Az nsp2TF génben létrejött mutáció csökkentette a vírus terjedését a sejtenyészetben (Fang et al., 2012).

## 4.2 Kórfejlődés

A PRRSV fertőzés során a vírus elsődleges célsejtjei az alveoláris makrofágok. A szövetkárosodás ezen sejtek apoptózisának (és nekrozisának) következménye, amelyet a fertőzött sejtek által kiválasztott apoptotikus citokinek, oxigén-szabadgyökök, valamint nitrogén-monoxid által a szomszédos sejtekben előidézett pusztulás súlyosbít. Ezzel egy időben gyulladáskeltő citokinek is felszabadulnak, amelyek további gyulladással sejtek helyszínre vándorlását okozzák, illetve felelőssé tehetőek egyes szisztémás tünetek (láz, levertség, étvágytalanság stb.) megjelenéséért (Gómez-Laguna et al., 2013).

Számos egyéb vírushoz hasonlóan a PRRS vírus a fertőzés kezdeti szakaszán – leginkább a nem szerkezeti fehérjei révén – jelentősen gátolja a természetes immunrendszer egyik legfontosabb vírusellenes mechanizmusát, az 1-es típusú interferon-termelést, ami lehetővé teszi a kórokozó gyors és hatékony szaporodását és terjedését a szervezetben belül (Chand et al., 2012; Lunney et al., 2016). A különböző vírustörzsek nagyban eltérhetnek immunmoduláns hatásuk tekintetében, és az általuk okozott klinikai tünetek, elváltozások valamint a fertőzés kimenetele nagymértékben függ az előbbieken ismertetett folyamatok egyensúlyának eltolódásától. A makrofágok károsodása/pusztulása emellett másodlagos fertőzések kialakulásához vezethet, amely gyakran megfigyelhető telepi körülmények között is (Chand et al., 2012; Lunney et al., 2016).

A PRRSV fertőzés nemcsak a légzőszerveket képes károsítani, hanem a magzatra is veszélyt jelent. A betegség tünetei kocáknál az állatok fülén és hüvelyén megjelenő kékes-vöröses elszíneződés, tömeges vetelés, koraellés, a megszületett almok pedig vegyesen tartalmazhatnak élő és elhalt magzatokat, amelyek a mumifikáció különböző fázisait mutatják (Karniychuk és Nauwynck, 2013). A kocák fertőződhetnek közvetlenül, fertőzött állattal történő kontaktus során, de az is

előfordulhat, hogy ondóval fertőződnek meg. Az ondóban, állattól függően, a vírusfertőzés után már 2 nappal megjelenhet a PRRSV és akár 92 napig is ürítheti vele az állat, bár ez az érték a sertés fajtájától is függ. (Christopher-Hennings et al., 2001; Karniychuk és Nauwynck, 2013). A vírus először a mandulákban és a tüdő makrofágjaiban telepszik meg, és akár egy rövid virémiás fázis során is eljuthat a méhnyálkahártya érhálózatába, ahol valószínűleg az érfalon átjutó differenciálódó monocitákat megfertőzve juthat a méh nyálkahártya kötőszövetébe, ahol a vírus további fogékony makrofágokat fertőzhet meg (Karniychuk és Nauwynck, 2013).

A különböző korú embriók és magzatok eltérő érzékenységet mutatnak a PRRSV fertőzéssel szemben. A fertőzés nincs hatással a beágyazódásra és a korai embriófejlődésre, a beágyazódott embriók 20 napos kor körül válnak érzékenyebbé az infekcióra. Összességében a korai embriófertőzések gyakorisága alacsony, de később káros következményekkel járhat, és akár háromszorosára is növelheti a normálisan is előforduló magzati elhalások számát. A vemhesség középső szakaszában fertőződött kocák magzataiban ritkán alakulnak ki elváltozások, és a halvaszülések száma is csak kismértékben emelkedik. Ám ha a fogékony koca a vemhesség késői szakaszában, főleg a 85-92. nap között fertőződik PRRSV-vel, akkor a magzatok nagy számban fertőződhetnek, és a halvaszületés gyakorisága jelentősen megnő. (Karniychuk és Nauwynck, 2013).

Bár 1-2 hét alatt nem alakulnak ki súlyos elhalások a placenta-méhnyálkahártya határán a vemhesség késői stádiumában levő, 1-es genotípussal fertőzött kocákban, mégis ezekben az állatokban szignifikánsan magasabb az apoptotikus sejtek száma, mint a nem fertőzöttekben. Ezek az elhalások valószínűleg a természetes ölösejtek (NK) működésének hatására jönnek létre, amelyek a fertőzött makrofágokat támadják a placentában. A magzati fertőződés harmadik-negyedik hetében a PRRSV fertőzés már kiterjedt apoptózist indukálhat az anya-magzat kapcsolódás mindkét oldalán, amelynek következtében súlyos gyulladás és elhalások alakulhatnak ki a placentában és a méhnyálkahártyában is (Karniychuk és Nauwynck, 2013). A 2-es genotípusú vírusokkal végzett kísérletekben a szöveti károsodásokat főleg a méhnyálkahártyában és sokkal kevésbé a placentában tapasztalták. Ezek az adatok azt mutatják, hogy mindkét genotípusnál a magzati károsodások fő oka az anya-magzat kapcsolódás sérülése, és a normális oxigén- és tápanyag ellátásának következményes romlása (Karniychuk és Nauwynck, 2013). Mindazonáltal a 2-es típusú vírusokkal végzett kísérletek arra utalnak, hogy a magzatokba jutott vírusnak is szerepe lehet a magzati elhalások indukációjában, mivel az elhaltak közel 100%-ból kimutatható volt a vírus, míg az élő magzatoknak mindössze 30%-a bizonyult pozitívnak (Ladinig et al., 2015a; Ladinig et al., 2015b; Novakovic et al., 2016).

A pontos mechanizmus jelenleg nem tisztázott, de a vírus elméletileg két úton juthat át a kocából a magzatba. Nagy valószínűséggel a PRRSV a koca vérkeringéséből sejtekhez kötötten jut át a vér-placenta gáton. Annak, hogy szabad virionok formájában kerülne át, jóval kisebb az esélye, mivel a sertések vér-placenta gátja még a sokkal kisebb méretű IgG (12 nm) számára is átjárhatatlan (Karniychuk és Nauwynck, 2013). A magzatok között a fertőzés terjedhet sejthez kötötten és szabad virionok formájában is. A szomszédos embriók fertőzöttsége növeli a magzati elhalás esélyét. A PRRSV a tüdő, a tímusz, a lép és a máj fogékony sejtjeiben replikálódik, de PRRSV pozitív sejtek találhatóak a magzatvízben és magzatburkokban is (Karniychuk és Nauwynck, 2013).

### **4.3 A PRRSV és az immunrendszer kölcsönhatása**

A virulenciát és patogénitást befolyásoló genetikai szakaszok helyzete és működése egyelőre nem tisztázott megnyugtatóan. A 2-es genotípusú törzsekkel végzett kísérlet azt bizonyította, hogy az ORF1b által kódolt nsp9-nek (RdRp) és nsp10-nek (RNS-helikáz) fontos szerepe van a vírus replikációjának hatékonyságában, és ez a szakasz befolyásolja a vírus virulenciáját és patogénitását. A régió cseréje két eltérő patogénitású törzs között nemcsak fokozta a virulenciát a gyengébb patogénitású (LP-PRRSV) törzsben, hanem a virulencia csökkenését okozta az erősebb patogénitásúban (HP-PRRSV) (Li et al., 2014).

Az ORF1a-val végzett kísérletek során azt tapasztalták, hogy a régió cseréje csökkentette HP-PRRSV virulenciáját, azonban fordított esetben egy gyengébb patogénitású vírussal egy ilyen csere nem járt a patogénitás növekedésével (Li et al., 2014). Ezzel ellentétesnek tűnő eredményre jutott egy amerikai kutatócsoport, amikor egy helyi 2-es genotípusú patogén vírus génjeit és génszakaszait cserélték ki egy attenuált, élő vakcinavírus szakaszaival. Azt találták, hogy a legnagyobb mértékű patogénitás csökkenést az nsp 3–8 közötti szakasz okozta, vagyis az attenuálódás során a legnagyobb hatású változások a nsp 3–8 részt kódoló génszakaszon történtek az ORF1a-n. Érdekesképpen, az nsp9 cseréje a 2-es genotípusú vad vírussal nem befolyásolta a patogénitást, vagyis az attenuálódás során ebben a részben nem történt változás (Kwon et al., 2008).

A PRRSV által okozott fertőzésre jellemző, hogy a neutralizáló ellenanyagok (NA) későn jelennek meg, legkorábban 2 héttel a fertőzés után lehet egyértelműen kimutatni a jelenlétüket, de szintjük még 42. nap után is viszonylag alacsony marad (1/32-1/64 NA titer). Ezzel szemben a nem neutralizáló ellenanyagok (NNA) viszonylag hamar, már 5-7 nap után megjelenhetnek, ám ahelyett, hogy védelmet adnának,

elősegíthetik az alveoláris makrofágok fertőződését. Ezt a folyamatot ellenanyag közvetítette erősítésnek nevezzük (ADE) (Mateu és Diaz, 2008). Megfigyelték, hogy viszonylag magas (1/16 és magasabb) NA szint képes megakadályozni a malacokban a virémiát, és a kocákban a vírus placentán való átjutását. A T-sejt közvetítette immunválasz kialakulása is fontos lépés a PRRSV fertőzés elleni immunitásban. Az NA-hoz hasonlóan ez is késleltetve jelentkezik, és alacsony szinten marad a PRRSV fertőzés során. Az első antivirális hatású INF- $\gamma$  termelő sejtek 3 héttel a fertőzés után jelennek meg, és számuk csak a 10. hét után éri el az 50-100 db/milliót a perifériás mononukleáris sejtek (PBMC) között. Ezzel szemben ez a szám Aujeszky-betegség esetén már a fertőzés utáni 3. héten eléri a 200-300 db/millió PBMC-t (Mateu és Diaz, 2008).

Ez a késleltetett immunreakció jól magyarázza a fertőzés perzisztens természetét. A méhben fertőződött malacokban a születés utáni 63. napon a tüdőből és a nem limfoid szövetekből a vírust nem lehet kimutatni. Azonban a mandulákban és nyirokszövetekben még 132 nappal a születés után is alacsony szintű vírusreplikáció detektálható. Az állatok csak a 260. napra válnak szeronegatívvá és ettől kezdve már nem képesek továbbadni a fertőzést (Rowland et al., 2003). A születés után fertőzött malacok is sokáig hordozhatják a vírust. Az állatok többségében PCR-rel a vírus torok és mandula kaparékából 80 nappal a fertőzés után is kimutatható. Egyes esetekben a detektálhatóság meghaladja a 150 napot (Wills et al., 1997).

#### **4.3.1 Társfertőzések**

Gyakran előfordul, hogy súlyos esetekből izolált PRRSV törzsek kísérletes fertőzésekben, laboratóriumi körülmények között nem képesek tünetekben megnyilvánuló megbetegedést előidézni (Choi et al., 2003). Az ilyen vizsgálatok ráirányították a figyelmet arra a tényre, hogy más kórokozók által okozott társfertőzések jelentősen befolyásolhatják a vírus által kiváltott tüneteket. A sertések légzőszervi tünetegyüttese (porcine respiratory disease complex, PRDC) az egyik olyan kórkép, amelynek kialakulásában a PRRSV sokszor szerepet játszik. Ezt a kórképet különféle vírusok, baktériumok és kedvezőtlen környezeti hatások kombinációja is kiválthatja, de egy átfogó vizsgálatnál az esetek több mint egyharmadából sikerült a PRRSV-t is kimutatni. A PRRSV leggyakoribb bakteriális társfertőzése a PRDC kórképpel diagnosztizált állatokban a *Pasteurella multocida* és *Mycoplasma hyopneumoniae* (*Mhp*) volt (Choi et al., 2003). A sertésekben egy 1-es típusú PRRSV fertőzés általában egy hétig tartó lázas állapotot, míg egy 2-es típusú törzs fertőzése jellegzetes légzőszervi tüneteket okoz (Nauwynck et al., 2014). Az *Mhp* társfertőzés jelentősen súlyosbíthatja a

tüneteket. Szövődménymentesen az *Mhp* idült, enyhe, lokalizált hörgő- és tüdőgyulladást okoz nem produktív köhögéssel, amely csökkent súlygyarapodással járhat. Azonban a társfertőzési kísérletekből kiderült, hogy a két patogén kölcsönhatása a vártnál bonyolultabb. Amennyiben a két patogén egyszerre fertőzi az állatokat, vagy egy folyamatban lévő PRRSV infekció felülfertőződik *Mhp*-vel, akkor az enyhe légzőszervi tünetek helyett közepesen súlyos vagy súlyos tünetek jelentkeznek. Ezzel szemben, ha már egy zajló *Mhp* fertőzés felülfertőződik PRRSV-vel, a tünetek nem súlyosbodnak szignifikánsan (Thacker et al., 1999).

A *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) egy kommenzalista baktérium a sertések légutaiban, ám egyes törzsei toxint termelnek (*Pasteurella multocida* toxin), ami súlyos betegséget, az úgynevezett progrediáló torzító orrgyulladást képes előidézni (Magyar et al., 2002). A toxint nem termelő, *P. multocida* törzsek viszont gyakran társulnak a PRRSV okozta fertőzések mellé, súlyosbítva a tüdőelváltozásokat, bár kísérletes körülmények között ezt nem mindig sikerül igazolni (Magyar et al., 2002).

Egy másik betegség, amelyhez gyakran társul a PRRSV, a malacok választás utáni sorvadásos kórképe (postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS). A PMWS fő kórokozója a 2-es típusú sertés cirkovírus (PCV-2) (Szeredi et al., 2012). Több tanulmány megerősítette, hogyha PCV-2 mellé PRRSV fertőzés társul, akkor súlyosabb formában nyilvánul meg a PMWS. Érdekességként megfigyelték, hogy a PRRSV felülfertőződés hatására magasabb vírus titert indukált a PCV-2, igaz, fordítva nem jelentkezett ilyen hatás (Allan et al., 2000; Szeredi et al., 2012). Egy amerikai tanulmányban 484 megerősített PMWS esetet vizsgáltak meg részletesen, és csak 9 esetben fordult elő, hogy PCV-2 volt az egyedüli patogén; 164 esetben a PRRSV-t is kimutatták és ebből 77 mintánál az *Mhp*, mint harmadik kórokozó jelenlétét is megerősítették (Pallarés et al., 2002).

#### **4.4 Gazdasági kártétel és vakcinázás**

A PRRS az egyik legnagyobb gazdasági károkat okozó fertőző betegséggé vált a sertésállományokban. Becslések szerint a vírus csak az Egyesült Államokban évente 664 millió dollár kárt okoz (Holtkamp et al., 2013). Dániában a kocánkénti veszteségeket körülbelül 31 euróra (Kristensen, 2012), míg Hollandiában 75 euróra becsülik évente (Nieuwenhuis et al., 2012). Figyelembe véve ezeket az értékeket, valamint az európai sertéspopuláció 13 millióra becsült kocaállományát, a PRRS által okozott veszteség a termelésben az Európai Unión belül évente meghaladhatja a 400 millió eurót. Ezek a károk a hatékony vakcinázással jelentősen enyhíthetőek lennének. A legnagyobb problémát az jelenti, hogy hatékony és hosszantartó védelmet adó

oltóanyag továbbra sem áll rendelkezésre (Charentantanakul, 2012; Mateu és Diaz, 2008), annak ellenére, hogy a kereskedelmi forgalomban több élő, attenuált vírust és inaktivált vírust tartalmazó vakcina is elérhető. Számos, a vírus biológiájából eredő oka van, hogy a jelenlegi vakcinák hatékonysága sok kívánnivalót hagy maguk után:

- A PRRSV gátolja több, az immunválasz kiváltásában fontos gazdafehérje (pl. 1-es típusú interferonok, TNF- $\alpha$ , MHC I és MHC II) kifejeződését (Mateu és Diaz 2008).
- A fertőzés során a vírus szerkezeti fehérjei nem jelennek meg a fertőzött sejtek plazmamembránján (Lunney et al., 2016; Mateu és Diaz 2008).
- A PRRSV szerkezeti fehérjei glikoziláltak. Ez az előbbi két pontban említett tényezőkkel egyetemben megnehezíti a specifikus neutralizáló ellenanyagok megjelenését és kötődését a vírushoz és a fertőzött sejtekhez (Ansari et al., 2006).
- A nem neutralizáló ellenanyagok ADE-t indukálnak.
- A gyorsan evolválódó genom (2-es genotípusban legalább 12 vonal) extrém antigén variabilitást okoz, aminek következtében a heterológ törzsek közös neutralizáló epitópjainak száma minimálisra csökken.

Az IFN- $\gamma$  válasz és a hozzáköthető vírusspecifikus T-sejt aktivitás döntő szerepet játszik a PRRSV elleni hatékony immunitás kialakításában. Mivel a T-sejt epitópok nem csak a strukturális fehérjéken (M, N, GP3, GP4, GP5), hanem a vírus nem strukturális fehérjein (nsp1 $\beta$ , nsp2, nsp5, nsp9, azaz RNS polimeráz és nsp10) is nagy számban megtalálhatóak, az összes vírusfehérjét expresszáló és jóval hatékonyabb T-sejtes immunitást kiváltó élő, attenuált vakcinák elméletileg sokkal hatékonyabb védelmet képesek indukálni, mint az inaktiváltak. A tapasztalat és a vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy az élő, attenuált vakcinák valóban csökkentik a PRRSV fertőzés következményeit. Csökken a vetélések aránya, és a fiatal malacokban véd a betegség klinikai tünetekben való megnyilvánulásától, köztük a testtömeg-gyarapodás csökkenésétől, elhullástól is. Ennek ellenére számos probléma merült fel az élő, attenuált vakcinák használatánál: i) vakcinázás után a védelem késleltetve alakul ki, csak 3-4 hét elteltével lehet kimutatni PRRSV elleni specifikus védőhatást, ii) a vakcina által nyújtott védelem főként genotípus specifikus (vagyis az 1-es genotípusú MLV, az 1-es típusú vad PRRSV ellen véd), de az is előfordul, hogy csak szubtypus vagy törzsspecifikus a védőhatás, iii) ugyanakkor komoly ártalmatlansági problémák is jelentkezhetnek a jelenleg alkalmazott élővírusos vakcinák használatakor, mivel képesek visszanyerni a patogenitásukat és ahelyett, hogy védelmet nyújtanának,



tovább súlyosbíthatják a már meglevő PRRSV okozta problémát (Charentantanakul, 2012; Lunney et al., 2016; Mateu és Diaz, 2008).

Az elölt vírust tartalmazó vakcinák ezzel szemben teljesen biztonságosak, ám hatékonyságuk és a kiváltott hatás reprodukálhatósága még a jelenleg forgalomban lévő élő, attenuált vakcináknál is kérdésesebb (Scotti et al., 2007; Zuckermann et al., 2007). Az inaktivált vakcinákkal oltott, PRRSV-re fogékony kocákban a vakcinázás általában nem akadályozza meg a heterológ vad vírussal történő fertőzés okozta szaporodási zavarokat, és hasonló esetben a növendék állatokban sem akadályozza meg teljes mértékben egy vad vírus okozta fertőzés következményeit. Az inaktivált vakcinák hatása főleg a vírussal már fertőzött állatokban érvényesül, melyekben valóban képes csökkenteni a vírusfertőzés kártételét (Charentantanakul, 2012).

## 5. Anyag és módszer

### 5.1 Diagnosztikai vizsgálatok

Az öt, PRRSV 9625/2012 fertőzésben elpusztult állat patológiai, virológiai és szerológiai vizsgálata a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (NÉBIH, Budapest) által használt protokollokon alapult. A PRRS vírus szerológia vizsgálatához, PCR-rel történő kimutatásához és az ORF5 gén szekvenálásához szükséges protokollok és primerek Dr. Balka Gyula és munkatársai által közölt cikkekből származnak (Balka et al., 2008; Balka, 2009).

A fertőzött hízósertésekből származó mintákat a leggyakrabban előforduló sertés kórokozókra vizsgálták, hogy kiderítsék, mi okozhatta az állatok megbetegedését. A klasszikus és afrikai sertéspestis, sertés influenzavírus, Aujeszky-betegség vírusa, sertés cirkovírus (PCV-2), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Salmonella choleraesuis*, *Streptococcus suis* kimutatását a mintákból az OIE-World Organisation for Animal Health által javasolt protokoll szerint végezték a NÉBIH Állat-egészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság (ÁDI) munkatársai. (<http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>)

### 5.2 Vírustörzsek eredete és a PCR templát előkészítése

A PRRSV-2/Hungary/102/2012-nek elnevezett PRRSV törzs Komárom-Esztergom megyéből, Ács közelében található 1-es genotípusú PRRSV-vel endémiásan fertőzött telepről származott, és a szövetmintát Dr. Balka Gyula (Állatorvostudományi Egyetem, Patológiai Tanszék) gyűjtötte. Az állományból szaporodási zavart nem jelentettek, és a vírus a fiatal sertések közt csak enyhe tüneteket okozott. A másik törzs (9625/2012) egy füzesgyarmati (Békés megye) nem vakcinázott, a járvány kitörése előtt PRRS mentes hízósertés telepről származott, a szövetmintát Dr. Kecskeméti Sándor (NÉBIH ÁDI Debrecen) gyűjtötte. A négy-öt hónapos állatok megbetegedésének aránya elérte a 90%-ot, de az elhullási arány alacsony (0,2%) maradt. A tünetek magas láz és légzőszervi panaszok formájában nyilvánultak meg, és néhány állat esetén a hátsó végtagok részleges bénulását, bőrben történő bevérvéseket figyeltek meg.

A PRRSV izolálását tüdőből és nyirokcsomóból Dr. Hornyák Ákos (NÉBIH ÁDI, Budapest) illetve Dr. Bálint Ádám (NÉBIH ÁDI Budapest) végezte. 0,5 g-nyi szövetet, antibiotikumot és gombaellenes szert tartalmazó PBS-ben (foszfáttal pufferolt sóoldatban) Tissue Lyser-rel (Qiagen, Hilden, Németország) homogenizálták. A sejttörmelék eltávolítása céljából a homogenizátumot 5000g-vel 10 percig centrifugálták. A felülúszóból 100 µl-t sertés alveoláris makrofágokat (PAM) tartalmazó tápoldatba

pipettáztak. A PAM sejteket diagnosztikai célra NÉBIH ÁDI munkatársai készítették. A makrofágokat RPMI-1640 nevű tápfolyadékban tartották, amelyhez 10% magzati szarvasmarha szérumot (FBS), 100 U/ml penicillint, 100 µg/ml streptomycint és 2 mM L-glutamint kevertek. A sejteket 5 napig inkubálták 37°C-os termosztátban 5% CO<sub>2</sub> szinten, majd a vírust tartalmazó felülúszót -80°C-os mélyhűtőben tárolták. Mivel citopatikus hatást nem figyeltek meg, így a felülúszóban a vírus jelenlétét kvantitatív reverz transzkripció PCR-rel (RT-qPCR) mutatták ki. A virális RNS-t QIAamp Viral RNA Mini Kittel (Qiagen, Hilden, Németország) vontuk ki a gyártó ajánlása alapján, majd ebből a cDNS-t 1 µl-nyi 50 µM T<sub>20</sub>-as primer hozzáadásával Superscript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) kit segítségével készítettük el a gyártó utasításait követve.

### **5.3 PCR protokoll a virális genom fragmentek amplifikációjához**

A PRRSV-2/Hungary/102/2012 és a 9625/2012 genomját öt, illetve hat egymással átfedő darabban sokszorosítottuk Phusion II HotStart PCR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) kittel. A PCR reakcióelegyek összeállításában a gyártó utasításait követtük. Pufferként az úgynevezett GC puffert, templátként 2 µl cDNS-t használtunk, az elegyhez 4%-nyi DMSO-t is hozzáadtunk, hogy csökkentsük a DNS olvadáspontját, a végtérfogatot 25 µl-re állítottuk be desztillált vízzel. Az izolátumok genotípusának meghatározásához sokszorosítottuk és szekvenáltuk az ORF5 gént. A genomfragmentek amplifikációjához szükséges, a 1. és a 2. táblázatban szereplő primerpárokat a Primer3Plus web alapú programmal (Untergasser et al., 2007) terveztük. A PCR-ek kivitelezése Biometra T professional gradient Thermocycler-ben (Biometra GmbH, Göttingen, Németország) történt (3 táblázat).

Az elkészült PCR fragmenteket 0,7%-os agaróz gélen futattuk 100V-on TAE pufferben (tris-acetát-EDTA puffer), majd a kivágás után a DNS-t QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével tisztítottuk a gyártó ajánlását követve. A genom végeit 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, version 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) kittel határoztuk meg.

### **5.4 Újgenerációs szekvenálás**

A PRRS vírusról származó PCR fragmenteket egyenlő moláris mennyiségben összekevertük, és templátként használtuk az újgenerációs szekvenáláshoz. A DNS-fragmentkönyvtárat NEBNext® Fast DNA Fragmentation & Library Prep Set for Ion Torrent (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) és Ion Torrent Xpress barcode adapter (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) segítségével Dr. Bányai Krisztián és

**1. táblázat:** A 9625/2012 genom amplifikációjához használt primerek és tapadási helyük a szekvencián.

Primer	Szekvencia	Tapadás helye
PR_EU_15F	ATTCCCCCTACATACACGACAC	15-36
PR_AVAC_2477F	CTCGGACTCCATGAAAGGAA	2477-2496
PR_EU_4719F	CCATGGTGTTCAAATCCTTTTT	4719-4740
PR_AVAC_9300F	TGTGGGAGAAACTGAAAAGTCA	9300-9321
PR_AVAC_11818F	TAAAATTAGCCAGCTGTTCGTG	11818-11839
PR_AVAC_2902R	ATGATAGAGCTGGATTCGGAAA	2902-2881
PR_AVAC_5337R	CGGTGTTAAGGCAGGGTTTATG	5337-5316
PR_AVAC_9859R	CATAGTCTGATGGGTGGGTGTA	9859-9838
PR_AVAC_12552R	TTGATGGTTAGCTCGAATGATG	12552-12531
Pr15047R	T(24)AATTCGGTCACATGGTTCCTGC CTG	15098-15073

**2. táblázat:** A PRRSV-2/Hungary/102/2012 genom amplifikációjához használt primerek és tapadási helyük a szekvencián.

Primer	Szekvencia	Tapadás helye
PR USA 1F	ATGACGTATAGGTGTTGGCTCTATG	1–25
PR USA 3248F	ACTCAGCTCAAGCCATCATCGACTC	3248–3272
PR USA 6408F	GTCTGCGCAAGTTCTGATGATCAGG	6408–6432
PR USA 9018F	GTGACTAAGAGAGGTGGCCTGTCGT	9018–9042
PR USA 12827F	CTTCGAGCTCACGGTGAATTACACG	12,827–12,851
PR USA 3358R	CAAGCTTAGTCGCATCACATGCCTC	3334–3358
PR USA 6709R	CAGAGAACACTCCATCGCCAACAAG	6685–6709
PR USA 9230R	ATACAGCACGAGGTCGTCCGAATAG	9206–9230
PR USA 12972R	GGAATCCTAGCTCGTCATGATCGTC	12,948–12,972
Pr15 USA 15397R	GGTTCTCGCCAATTAATCTCACCC	15,373–15,397

**3. táblázat:** Az PCR programok hőmérsékleti paraméterei.

Lépés	Hőmérséklet (°C)	Időtartam	Ciklusszám
kezdeti denaturáció	98	1 perc	1
denaturáció	98	20 másodperc	35
primer kötődés	54-72	20 másodperc	
szintézis	72	5 perc	1
végző szintézis	72	5 perc	1

munkatársai (MTA ATK ÁOTI, Új kórokozók felderítése témacsoport) készítették el a gyártó utasításait követve. Az emulziós PCR-t és keletkező ion sphere részecskék (IPS) tisztítását OneTouch v1 eszközzel és Ion OneTouch ES pipettázó robottal (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), a gyártótól vásárolt reagensek (Ion OneTouch™ Template Kittel) alkalmazásával végezték. A szekvenálás 316-os méretű szekvenáló chipen történt Ion Torrent PGM platformon (Ion Personal Genome Machine (PGMTM); Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). A szekvenciák illesztését a SeqMan Ngen szoftverrel (Lasergene, Madison, WI, USA) végeztük.

## **5.5 Filogenetikai törzsfa-rekonstrukció módszerei**

### **5.5.1 PRRSV-2/Hungary/102/2012**

16 darab 1-es genotípusú és 199 darab 2-es genotípusú PRRSV teljes genom szekvenciáját illesztettük a PRRSV-2/Hungary/102/2012 (102HU) szekvenciához. A szekvenciákat a génbankból (GenBank; Altschul et al., 1990) töltöttük le, és a deléciókat és inzerciókat tartalmazó részeket töröltük. A végső adatsor összesen 12911 nukleotid pozíciót tartalmazott. Az illesztésükhöz a Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation (MUSCLE) (Edgar, 2004) algoritmust használtuk a Geneious Pro 6.1.7 szoftverben (Biomatters Ltd., Új-Zéland). A filogenetikai elemzést a MEGA 6.0 szoftvercsomaggal (Tamura et al., 2013) végeztük el. A teljes genomon alapuló törzsfa-rekonstrukció a Tamura–Nei modelljén (Tamura és Nei, 1993) alapuló maximum likelihood módszer segítségével történt. Az ábrán legmagasabb log valószínűséggel (-266,940) rendelkező fa szerepel. A törzsfán az ágak hossza arányos az egy nukleotidra eső szubsztitúciók számával.

BLASTn keresés alapján a legnagyobb hasonlóságot az Egyesült Államokbeli és kanadai izolátumokkal mutatta, így innen származó szekvenciákból építettük az ORF5 adatbázist (3. függelék). Az adatbázisunkat a 2-es genotípus filogenetikai rendszerezésénél használt törzsekkel is bővítettük (Shi et al., 2010b). Az ORF5 szekvenciákat MUSCLE algoritmussal illesztettük, majd a filogenetikai törzsfán helyzetüket MEGA 6.0 programmal a Tamura–Nei modellt (Tamura és Nei, 1993) alkalmazva, maximum likelihood módszer határoztuk meg. Az elkészült fa szerkezetét 1000 bootstrap ismétléssel erősítettük meg.

A Recombination Analysis Tools (RAT) (Etherington et al., 2005) programmal rekombinációs eseményekre utaló változásokat kerestük a genomban. Az inzerciók és deléciók jelenlétét úgy azonosítottuk, hogy a 102HU szekvenciáját VR-2332 és CHN-JXA1 törzsekhez illesztettük MUSCLE algoritmussal. Az N-glikozilációs helyeket a NetNGlyc 1.0 Server web utility (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) segítségével

határoztuk meg. Az antigén régiókban történt mutációk feltárásához a VR-2332, a Ch-1a és a NVSL 97-7895 referenciatörzsek szekvenciáját illesztettük a 102HU-hoz (4. táblázat). Az ábrák elkészítéséhez a GeneDoc 2.7 programot (Nicholas és Nicholas, 1997) használtuk.

**4. táblázat:** A disszertációban említésre kerülő PRRSV törzsek hivatkozási száma és származási helye

<b>GenBank hivatkozási szám</b>	<b>Törzs neve</b>	<b>Genotípus</b>	<b>Származási helye</b>
<b>U87392</b>	VR-2332	2-es	USA
<b>AY032626</b>	Ch-1a	2-es	Kína
<b>AY545985</b>	NVSL 97-7895	2-es	USA
<b>EF112445</b>	JXA1	2-es	Kína
<b>DQ366650</b>	HU12	2-es	Magyarország
<b>EF406336</b>	HU21	2-es	Magyarország
<b>U64932</b>	IAF 93-2616	2-es	Kanada
<b>AF303357</b>	Ingelvac MLV	2-es	Boehringer, Ingelheim, Vetmedica (USA)
<b>JX044140</b>	VR-2385	2-es	USA
<b>KM514315</b>	PRRSV-2/ Hungary/102/2012 (102HU)	2-es	Magyarország
<b>KC522648</b>	36M	2-es	Szlovákia
<b>KJ415276</b>	9625/2012	1-e	Magyarország
<b>KF203132</b>	Olot/1991	1-es	Spanyolország
<b>GU067771</b>	AmerVac PRRS	1-es	Laboratorios Hipra S.A. (Spanyolország)
<b>KR296711</b>	HU-14432/2011	1-es	Magyarország

#### 5.5.2 9625/2012 törzs

A DNS és a fehérje szekvenciák illesztése a MEGA 5.1 szoftverrel (Tamura et al., 2011) történt. A filogenetikai törzsfá építésénél a neighbor-joining algoritmust (Saitou és Nei 1987) alkalmaztuk Kimura 2-paraméteres modellel (Kimura, 1980). Az elkészült fa szerkezetét 1000 bootstrap ismétléssel erősítettük meg. A teljes genomban előforduló rekombinációk ábrázolásához SimPlot programot (Lole et al., 1999) használtuk. Az N-glikozilációs helyeket a NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)

segítségével határoztuk meg. Az antigénrégiókban történt mutációk azonosításához a 9625/2012-höz az Amervac MLV és az Olot/1991 törzs szekvenciáját (4. táblázat) illesztettük. Az ábrák elkészítéséhez a GenDoc 2.7-es programot használtuk (Nicholas és Nicholas, 1997).

## 5.6 A FLAG és GFP fúziós konstrukciók létrehozása

Ha sejten belül akarjuk egy fehérje működését vagy expresszióját tanulmányozni, a vizsgált fehérjét fúziós fehérjeként, a fluoreszcens GFP-vel összekapcsolva expresszálhatjuk. Ha GFP-t kék fénnel gerjesztjük, akkor zöld színnel fluoreszkál, így akár élő sejtben is nyomon követhetjük egy vele fuzionáltatott fehérje expresszióját. Fúziós konstrukciókat úgy is létrehozhatunk, hogy a vizsgált fehérje kódoló régiójának végéről a stop kodont eltávolítjuk, és azonos leolvasási keretben a fúziós partner (GFP) start kodonjához kapcsoljuk. A nukleokapszid gén mindhárom leolvasási keretét a pEGFP-N1 vektorban (Takara Bio Inc., Kusatsu, Shiga, Japán) az eGFP riportergénnel fuzionáltuk. Az expressziós vektor cytomegalovírus (CMV) promotert tartalmazott és kanamycin rezisztencia gént hordozott. A vírus RNS-ét QIAamp Viral RNA Mini Kittel (Qiagen, Hilden, Németország) vontuk ki, majd ebből T<sub>20</sub> primerrel cDNS-t készítettünk a Superscript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) kittel a gyártó ajánlását követve. A cDNS-ről a vizsgálandó ORF-et tartalmazó inzertet 7-es sg-mRNS transzkripciót szabályzó szekvenciájától (TRS-től) (leaky scanning lehetőségének figyelembe vétele miatt) a stopkodon előtti tripletig a 14432/2012 törzsből sokszorosítottuk Phusion Hot Start II DNA Polymerase használatával (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) (5. és 6. táblázat). A PCR termékeket a FastDigest *Xho*I és *Bam*HI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) restrikciós enzimekkel emésztettük, majd T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) enzimmel a korábban *Xho*I és *Bam*HI enzimmel meghasított pEGFP-N1 vektorokkal egyesítettük. Mindhárom inzert elkészítésénél ugyanazt a forward primert (7F) alkalmaztuk. A három reverz primer egymástól csak egy-egy nukleotidban tért el (7r, 7ar és 7ncr), ezzel értük el a fúziós konstrukciókban a translációs keret eltolódását (7. táblázat).

Mivel az eGFP-t kódoló szakasz 708 nukleotid hosszúságú, így méreténél fogva befolyásolhatja az átíródó mRNS térszerkezetét, hiszen a vizsgálandó ORF-ek mindössze 105-159 nukleotid hosszúságúak. A kapott eredményeket 3xFLAG peptiden (66 nukleotid) alapuló fúziós konstrukciók létrehozásával ellenőriztük. A fehérje-FLAG fúziós rendszerek elkészítéséhez a pcDNA3-FLAG plazmidot használtuk. Ez a pcDNA3 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) általunk módosított változata,

melyben az *XhoI* és *XbaI* hely közé a 3xFLAG szekvenciáját ligáltuk (aminosavszinten: DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK). A 3xFLAG inzertet úgy hoztuk létre, hogy a 3flagF és 3flagR oligonukleotidok keverékét (7. táblázat) 5 percig 65°C-on tartottuk, majd 3 percre jégre tettük. A nukleokapszid gén (ORF7) mindhárom leolvasási keretét a pcDNA3-FLAG-ben a 3xFlaghez illesztettük. Az ORF7 gént tartalmazó inzerteket a *BamHI* és *XhoI* enzim hasítóhelye közé klónoztuk. A fehérje-FLAG fúziós konstrukciók létrehozásához ugyanazokat a protokollokat és enzimeket használtuk, mint az eGFP fúziós rendszerek esetén. Mindhárom inzertnél közös forward primer (7Ff) alkalmaztunk, és a három reverz primer egy-egy nukleotidban (7Rf, 7arf és 7ncrf) tért el egymástól (7. táblázat).

### **5.7 Az eGFP-N1 mutáció és ORF7a-GFP fúziós konstrukció**

Az eGFP startkodonját a pEGFP-N1 vektorban a gfp\_mut\_fw és a gfp\_mut\_rev primerpár segítségével (7. táblázat) mutáltattuk (Quick change site directed mutagenesis (Papworth et al., 1996)). A kapott plazmidot p-MeGFPN1-nek neveztük el. Az ORF7a gént a cDNS-ről az F-gfp-orf7a és R-gfp-orf7a primerpárral szaporítottuk fel Phusion Hot Start II DNA Polymerase használatával és a keletkező terméket *XhoI* és *BamHI* restriktív enzimmel emésztettük. A korábban hasított vektorokat és inzerteket T4 DNA Ligase enzimmel egyesítettük.

Összes konstrukciót Marc 145 (Kim et al., 1993) és PT sejtenyészetben (Bergeron et al., 1993) vizsgáltuk. A sejteket 10% FBS, 100 U/ml penicillint, 100 µg/ml streptomycint és 1 mM nátrium-piruvátot tartalmazó DMEM-ben tartottuk 5% CO<sub>2</sub>-ban 37°C-os termosztátban. A sejteket 24-lyukú sejtenyésztő lemezen növesztettük és a plazmidokat gyártó utasítását követve TurboFect Transfection Reagents (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) segítségével transzfektáltuk.

### **5.8 A 7ap fehérjék szintézise**

A peptideket, az 1-es genotípusú HU-14432/2011 törzs 7ap peptidjét (Hu7ap-t) (MTSGTTSPRLNAPSACNRSRRLSIKAQELRRFHPAGRSVFRLSLCCR) és egy 2-es genotípusból (WuH4) származó 7ap peptidet (Wu7ap-t) (MTSGITLPLVSGN CVCRRSRLPSIRVLELVPCQIQGG) a CASLO ApS (Lyngby Denmark) cégtől 95%-os tisztaságban rendeltük. A liofilizált peptideket PBS pufferben oldottuk fel, és koncentrációjukat 2 mg/ml-re állítottuk be. A Wu7ap peptidnél 10 mg/ml koncentrációjú oldatot is készítettünk.



5. táblázat: A PCR reakcióelegy összetétele a Phusion Hot Start II DNA Polymerase esetén.

Összetevők	Térfogat (végkoncentráció)
desztillált víz	25 µl-re kiegészítve
HF puffer (5x)	5 µl (1x)
dNTP	0,5 µl (200 µM)
primer F	1,2 µl (0,5 µM)
primer R	1,2 µl (0,5 µM)
DNA polimeráz	0,3 µl (0,5 egység)
cDNS	1 µl

6. táblázat: A FLAG és GFP fúziós konstrukciók és ORF7a gén sokszorosításához szükséges PCR program hőmérsékleti paraméterei.

Lépés	Hőmérséklet (°C)	Időtartam	Ciklusszám
kezdeti denaturáció	98	30 másodperc	1
denaturáció	98	8 másodperc	30
primer kötődés	55	20 másodperc	
szintézis	72	45 másodperc	
végző szintézis	72	2 perc	1

7. táblázat: A FLAG és GFP fúziós konstrukciók létrehozásához szükséges primerek, 3XFLAG riportergén primerjei, ORF7a gén sokszorosításához és pEGFP-N1 vektorban az eGFP startkodon mutációjához szükséges primerek listája.

Primerek	Szekvenciájuk
7F	GAGGATCCTTAACCTCGTCAAGTATGGCCG
7r	GACTCGAGTGGCGCACTGTATGAGCAA
7ar	GACTCGAGTTGGCGCACTGTATGAGCAA
7ncr	GACTCGAGGGCGCACTGTATGAGCAA
3flagF	TCGAGTGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATG ACATCGACTACAAGGATGACGATGACAAGTAGTGAA
3flagR	CTAGTTCACTACTTGTTCATCGTCATCCTTGTAGTCGATGTCATG ATCTTTATAATCACCGTCATGGTCTTTGTAGCAC
7Ff	GACTCGAGTTAACCTCGTCAAGTATGGCCG
7Rf	GAGGATCCGGCGCACTGTATGAGCAA
7arf	GAGGATCCTTGGCGCACTGTATGAGCAA
7ncrf	GAGGATCCGGCGCACTGTATGAGCAA
gfp_mut_fw	CCACCGGTCGCCACCGCGGTGAGCAAGGGCGAG
gfp_mut_rev	CTCGCCCTTGCTCACCGCGGTGGCGACCGGTGG
F-gfp-orf7a	CAACTCGAGATGACATCCGGCACCACTC
R-gfp-orf7a	CAAGGATCCTTGGCGCACTGTATGAGCAACCGGCAGCACAAA CTC

## 5.9 Indirekt immunfluoreszcencia

A sejteket 24-lyukú sejttenyésztő lemezen (Orange Scientific, Braine-l'Alleud Belgium) növesztettük. A lemez lyukaiba 12 mm átmérőjű 0,1 mm vastagságú üveglemezeket helyeztünk, hogy a mikroszkópos vizsgálatokat megkönnyítsük. A sejteket úgy passzáltuk, hogy másnapra körülbelül 70%-os (kb.  $1,4 \cdot 10^5$  sejt) összenövést érjenek el, mivel ez elősegíti a hatékony transzfekciót. A fehérje-FLAG fúziós vektorokkal transzfektált sejteket 48 óra elteltével 300  $\mu$ l 3%-os formaldehiddel 15 percig fixáltuk, majd kétszer 1 ml IF pufferrel (5 g/l-es BSA/PBS oldatban) mostuk. A sejteket szobahőmérsékleten 200  $\mu$ l 1% Triton-X 100 (PBS-ben) oldatban permeabilizáltuk, negyed óra elteltével kétszer mostuk őket, majd hozzáadtuk az 1000-szeresre hígított 200  $\mu$ l-nyi elsődleges ellenanyagot és 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. A FLAG fúziós fehérjék kimutatásához az egér anti-FLAG M2 monoklonális ellenanyagot használtuk (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). A mosást követően a lemezre 200  $\mu$ l-nyi 1000-szeresre hígított CF594 kecske anti-egér ellenanyag (Biotium Hayward, California, USA) és Hoechst 33342 magfesték (1  $\mu$ g/ml) keverékét mértük. Az elsődleges és másodlagos ellenanyagok hígítása az ellenanyag hígító pufferben (4%-os PBS-ben hígított ló szérumban 0,3% Triton X-100-zal) történt. Egy óra inkubálás után IF pufferrel mostuk, és kiemeltük a 24-lyukú sejttenyésztőből az üveglemezeket. A tárgylemezre egy csepp Fluoroshieldet (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) cseppentettünk, majd az üveglemezeket sejtekkel lefelé ráhelyeztük, és megszáritottuk őket. A bemutatott képeket a Zeiss Axio Observer D1 inverz fluoreszcens mikroszkóppal készítettük, és Zen 2012 programmal szerkesztettük.

## 5.10 Direkt ELISA

A 7ap peptidet pufferrel (0,1 M  $\text{NaHCO}_3$ , pH=8) 20  $\mu$ g/ml-re hígítottuk, majd az ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) lemezre (Nunc-Immuno MicroWell 96 well, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 100-100  $\mu$ l-t pipettáztunk a hígított fehérjéből, és 4°C-on egész éjszakán át inkubáltuk. Következő nap háromszor 200  $\mu$ l mosópufferrel (0,5% TWEEN 20 PBS oldatban) mostuk a lemezt, és 200  $\mu$ l blokkoló pufferrel (1% BSA/PBS oldat) egy órán át 37°C-on kezeltük, hogy szabad helyekre történő aspecifikus ellenanyag kötődést megakadályozzuk. A különböző állatfajokban termeltetett, torma-peroxidázzal (HRP-vel) jelölt ellenanyagokból öt lépésben hígítást (500-szorostól 4000-szeresig) készítettünk (8. táblázat), és 100-100  $\mu$ l-t mértünk az Hu7ap-val bevont lemezre. Negatív kontrollként a blokkoló puffert használtuk. Egy órán át tartó inkubáció után háromszor mostuk a lemezt, majd hozzáadtunk 100  $\mu$ l ABTS (2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium só) oldatot (Ingenasa, Madrid,

Spanyolország). 20 perc inkubációt követően 5%-os nátrium-dodecilszulfát (SDS) oldattal leállítottuk a reakciót, és 410 nm hullámhosszon ELISA olvasóval (ELx800 ELISA plate reader, Dialab GMBH., Ausztria) lemértük a fényelnyelési (optical density, OD) értékeket. Minden egyes ellenanyag hígításból három darabot készítettünk, és a kapott eredményeket átlagoltuk.

### **5.11 Indirekt ELISA**

A felhasznált pufferek és az ELISA lemezek előkészítése megegyezett a közvetlen ELISA részben tárgyalt protokollal. A blokkolása után, négy PRRSV pozitív és egy PRRSV negatív sertés szérumból hat lépésben kétszeres hígítási sort (20-szorostól 640-szeresig) készítettünk, majd ráértünk 100 µl-t a lemezre és egy óra hosszat inkubáltuk. A mosás után 1000-szeresre hígított nyúl anti-sertés IgG H&L-HRP-t mértünk rá, és egy órán át szobahőmérsékleten állni hagytuk. Az eredményt a mosási lépés után (3-szor mosópufferrel), ABTS szubsztráttal hívtuk elő, és ELISA olvasóval mértük le az OD értékeket.

### **5.12 Komplementkötés gátlási próba**

Első lépésként egy komplementkötési próbát állítottunk össze. Egy 96 lyukú „U”-aljú lemezen 25 µl Veronal pufferben (Idexx laboratories, Westbrook, Maine) 2,5%-ra hígított, frissen elkészített mosott juh vörösvértestet összekevertünk 25 µl 2000-szeresre hígított hemolizinnel (nyúl anti-juh vörösvértest IgG) (Virion/Serion, Würzburg, Németország), majd 25 µl tíz lépésben hígított (4%-tól 0,4%-ig) tengerimalac komplementet (Virion/Serion, Würzburg, Németország) adtunk hozzá. A mintákat 37°C-on, fél órán át inkubáltuk, majd leolvastuk az eredményt. Minden reakciót és hígítást Veronal pufferben (Idexx laboratories, Westbrook, Maine) végeztünk. Teljes hemolízist (2%-os) okozó koncentrációnál 1%-kal magasabb (3%-os) komplement koncentrációt használtunk a komplementkötés gátlási próbában, hogy kizárjuk a fals pozitív eredményeket. A tesztben a staphylococcus protein A-t (spA-t) alkalmaztunk negatív kontrollként. Minden fehérjéből hat lépésben felező hígítást készítettünk, a peptid mennyiség a Hu7ap-nál 1,5 µg-ról, a Wu7ap-nál 6 µg-ról, a spA-nál 1,5 µg-ról indult. A hígított fehérjéket hozzáadtuk a hemolizinhez, és egy órán át 37°C-on inkubáltuk. Az egy óra letelte után hozzákevertük az optimális mennyiségű komplementet és juh vörösvértestet, további 20 percig inkubáltuk 37°C-on, majd kiértékeljük az eredményeket.

**8. táblázat:** A közvetlen ELISA tesztben felhasznált ellenanyagok neve magyarul, és angolul, valamint a gyártó cég neve.

Ellenanyag (angol név)	Magyar név	Gyártó
<b>polyclonal swine anti-rabbit immunoglobulins/HRP</b>	poliklonális sertés anti-nyúl immunoglobulin/HRP	DAKO A/S, Glostrup, Dánia
<b>goat anti-pig IgG(H+L)-HRP</b>	kecske anti-sertés IgG (H/L)	AbD Serotec, Kidlington, UK
<b>goat anti-chicken IgY(H+L)-HRP</b>	kecske anti-csirke IgY (H+L)-HRP	SouthernBiotech, Birmingham, Alabama, USA
<b>mouse anti-rabbit IgG-HRP</b>	egér anti-nyúl IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
<b>rabbit anti-pig IgG H&amp;L-HRP</b>	nyúl anti-sertés IgG H&L-HRP	Abcam, Cambridge, UK

### 5.13 DNS és RNS géletardációs teszt

Az RNS próbát a nukleokapszid leolvasási keretéhez fuzionáltatott FLAG fúziós vektorról transzkriptáltuk. A plazmidot először *Xba*I-gyel linearizáltuk, majd az RNS-t a TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kittel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) írtuk át a gyártó ajánlását követve. Az elkészült RNS-t DNázssal kezeltük, majd High Pure Viral Nucleic Acid kittel (Roche, Basel, Svájc) tisztítottuk.

A kétszálú DNS létrát a *Pvu*II és *Hind*III restrikciós enzimmal emésztett pIRES-AcGFP1 plazmidból állítottuk elő. Egyszálú DNS próbaként a PRRS3END (GGCAGGAACCATGTGACCGAAATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGTTCGGC ATGGC) oligonukleotid primert használtuk.

Egyszálú DNS-fehérje tesztben 200 ng-nyi PRRS3END-hez felező hígításban (8 µg-tól 0,5 µg-ig) 7ap peptidet adtunk, majd a végtérfogatot pufferrel (4mM MgCl<sub>2</sub> 0,5 TE pH=8) 7 µl-re egészítettük ki. A kétszálú DNS-fehérje tesztben 7 µl végtérfogatban 500 ng emésztett pIRES-AcGFP1 plazmidhoz felező hígításban 7ap fehérjét mértünk (Hu7ap esetén 0,5 µg-tól 0,0625 µg-ig, Wu7ap-nál 2 µg-tól 0,25 µg-ig). Az RNS-fehérje tesztnél 1,3 µg RNS-hez 1 µl RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) adtunk, majd belemértük a 7ap peptidet felező hígításban (10 µg-tól 1,25 µg-ig), és a térfogatot 8 µl-re egészítettük ki. Minden mintát 45 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd 4 µl-nyi felvivő puffert (25 mM TrisHCl pH=8 és

25% glicerinnel) mértünk bele. A mintákat felvittük 6%-os nem denaturáló poliakrilamid géltre, amelyet az Ornstein-Davis által alkotott protokoll szerint öntöttük (Ornstein és Davis, 1964), majd 110V-on Tris-glicin pufferben (25 mM Tris és 192 mM glicin oldatában) futattuk. A nukleinsavakat GelRed Nucleic Acid Gel Stain-nel (Biotium, Hayward, California) festettük a gyártói protokollnak megfelelően, majd kiértékeljük az eredményeket.

#### **5.14 Fehérje-fehérje gélretardációs teszt**

A tesztet 0,01 M kálium-foszfátot tartalmazó, 75 mM nátrium-klorid (pH=7,2) pufferben állítottuk össze. Két különböző állatból származó IgG-t használtunk, egy egér monoklonális IgG-t és sertés poliklonális IgG-t. A fragmenteket, a sertés IgG Fc fragmentet és a sertés IgG (Fab')<sub>2</sub> fragmentet a Rockland Immunochemicals-tól (Pennsylvania, USA) szereztük be. 8-10 µg IgG vagy IgG fragmentekhez felező hígításban Wu7ap és Hu7ap fehérjét adtunk (legnagyobb 50 µg, a legkisebb hozzáadott mennyiség 2 µg volt). A végtérfogatot 14 µl-re állítottuk be, majd az ellenanyag és 7ap keveréket 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az idő letelte után hozzáadtunk 6 µl-nyi felvivő puffert, és a mintát 2 órán át futattuk 120V-on Tris-glicin pufferben, nem denaturáló poliakrilamid gélen. A gélét 0,1%-os Coomassie Brilliant Blue R250-nel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) festettük, majd lefényképeztük, és kielemeztük a kapott eredményt.

#### **5.15 Állatok immunizálása**

Két BALB/c egeret kétszer izomba adott 0,2 ml Hu7ap tartalmú emulzióval immunizáltunk. Az oltóanyagot úgy készítettük el, hogy 70 µl-nyi 20 µg Hu7ap-t tartalmazó PBS oldatot összekevertük 130 µl-nyi paraffinolajjal és tiomerzál-tartalmazó adjuvánssal (Merial, Lyon, France). A két injekció közt két hét telt el. Negatív kontrollnak egy Hu7ap-hez hasonló méretű peptiddel, a K1p-vel (MEVYHFQMQLPWPALHSGPCPSRRKCCRSPFNLSVW) immunizált BALB/c egeret használtunk.

A másik immunizációs kísérletben két darab, 6 hetes korú, igazoltan PRRS mentes sertésállományból származó magyar nagyfehér malacokat oltottunk 7ap tartalmú emulzióval. Az oltásokat kétszer végeztük, és két oltás közt mindkét állat esetén 17 nap telt el. Az egyik malacnál az oltóanyag 20 µg-nyi (160 µl térfogatban) HU7ap és 340 µl paraffin olaj és tiomerzál keverékéből (Merial, Lyon, Franciaország), a másik állatnál az oltóanyag 20 µg-nyi (250 µl térfogatban) Hu7ap-ből és 250 µl inkomplett Freud

adjuvánsból állt. Az állatokat 3 héttel a második oltás után feláldoztuk az Állatvédelmi Törvénynek megfelelő módon.

### **5.16 Autoellenanyagok kimutatása indirekt immunfluoreszcenciával**

Autoellenanyagok kimutatására indirekt immunfluoreszcenciát alkalmaztunk. 24-lyukú sejtenyésző lemezekre úgy passzáltunk Marc 145 és PT sejteket, hogy az összenövés 24 óra elteltével körülbelül 70%-os (kb.  $1,4 \cdot 10^5$  sejt) legyen. Elsődleges ellenanyagként az immunizált állatokból származó, több lépésben (20-szorostól 1000-szeresig) hígított vérsavót használtuk. Egerekben negatív kontrollként a K1p-vel immunizált állatok savóját, a sertések esetén negatív kontrollként az immunizálás előtt levett savót alkalmaztuk. Másodlagos ellenanyagként 1000-szeresre hígított CF594 kecske anti-egér és CF568 kecske anti-disznó IgG-t (Biotium Hayward, California, USA) használtuk. Az inkubáció időtartama, a pufferek és a mosások száma megegyezett a FLAG konstrukciók kimutatásánál használt protokollal. A bemutatott képeket a Zeiss Axio Observer D1 inverz fluoreszcens mikroszkóppal készítettük, és Zen 2012 programmal szerkesztettük.

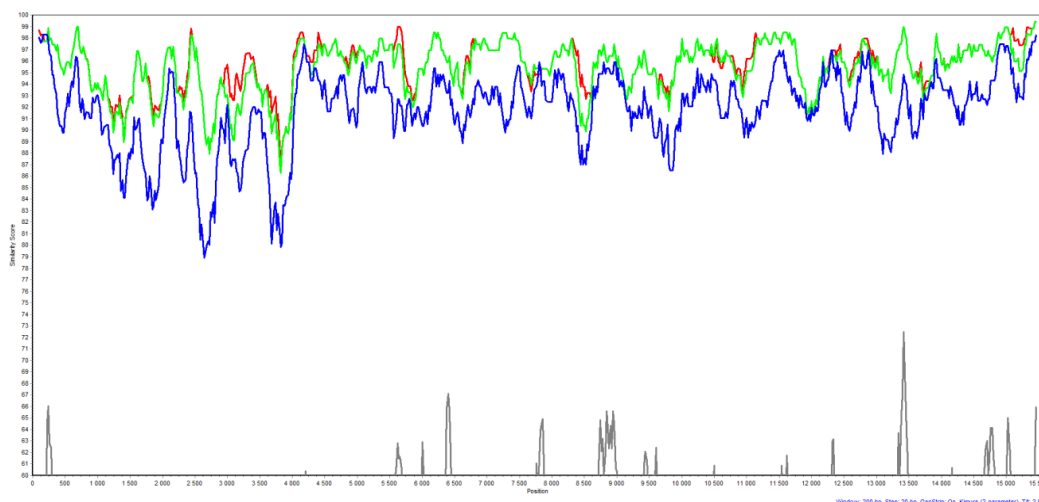
## 6. Eredmények

### 6.1 Magyarországi PRRSV minták teljes genom szekvenciájának elemzése

#### 6.1.1 PRRSV 9625/2012 izolátum eredete és filogenetikai elemzése

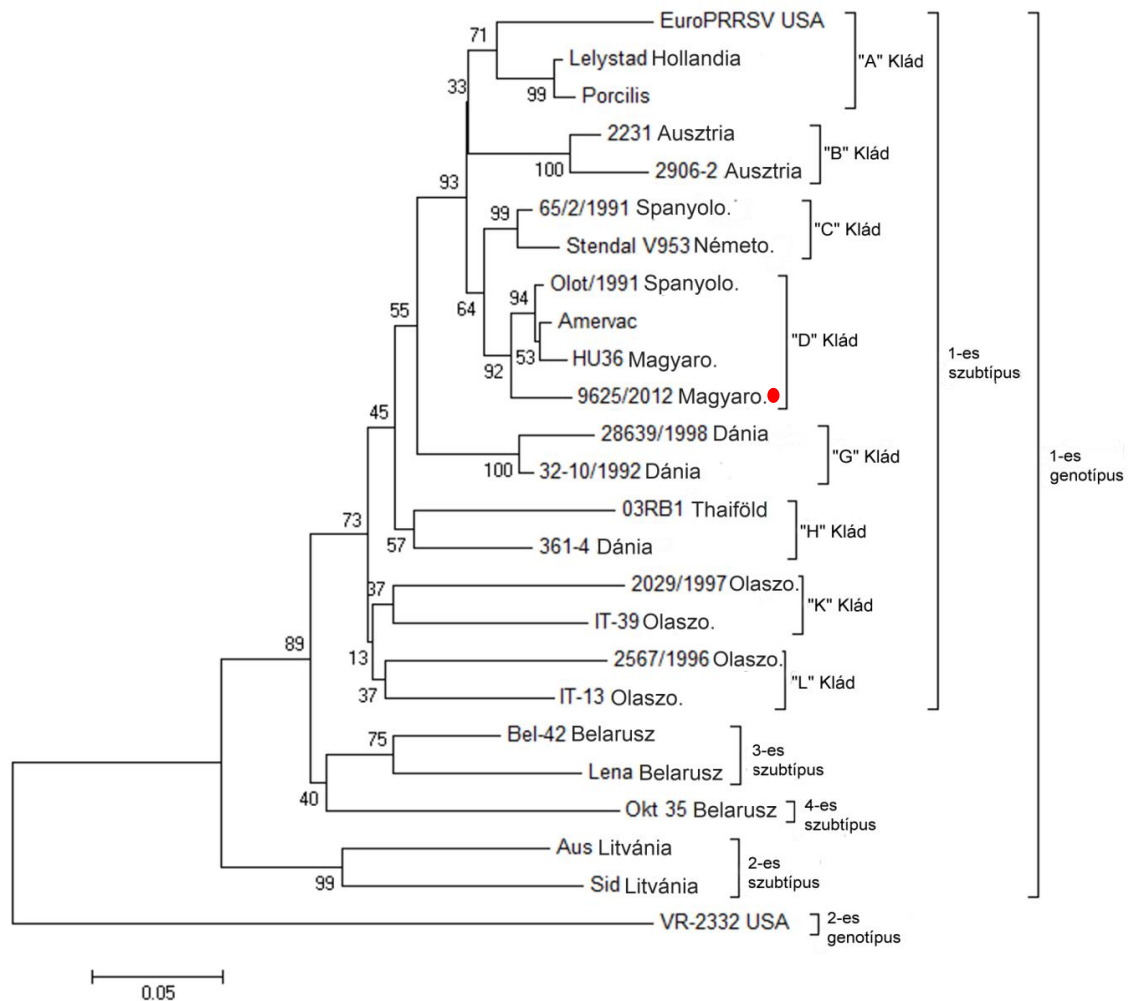
A 9625/2012 genomszekvenciája a teljes genom illesztését követően 15098 nukleotidnak bizonyult. A GenBank adatbázisába KJ415276.1 azonosítószámmal került be. A nukleotid szekvencia 96%-os egyezést mutatott az Amervac MLV-vel (vakcinatörzs) és 95%-nyit Olot/1991-vel. A legelőször izolált 1-es genotípusú PRRSV-vel, a Lelystaddal 92%-nyi, az első 2-es típusú törzssel, a VR-2332-vel 58%-nyi nukleotid egyezést tapasztaltunk. A legnagyobb egyezést mutató törzsekhez illetve, nem találtunk deléciókat vagy inzerciókat a szekvenciában. Összesen 613 nukleotidnyi (4%) különbség volt az Amervac MLV és 9625/2012 közt, ez felveti azt a lehetőséget, hogy a két vírus közvetlen leszármazási kapcsolatban áll.

A PRRSV törzsek genomjában, az utóbbi időben több rekombinációs helyet is azonosítottak (Martín-Valls et al., 2014). A SimPlot elemzéssel a rekombináció lehetőségét vizsgáltuk a 9625/2012 genomjában, és ehhez az Amervac MLV, az Olot/1991, a Lelystad és a VR-2332 törzs teljes genomszekvenciájával hasonlítottuk össze. Az eredményeink alapján a genom nem tartalmazott rekombinációt (3. ábra).



**3. ábra:** 9625/2012 genom SimPlot elemzése. 9625/2012-t a következő törzsekhez hasonlítottuk: Amervac MLV (piros), Olot/1991 (zöld), Lelystad (kék) és VR-2332 (szürke). Az Y tengely mutatja a hasonlóságot (%-ban megadva). Az X-tengelyen a nukleotid pozíciókat ábrázoltuk. A csúszó ablak és a lépéshossz mérete 200 nukleotid, illetve 20 nukleotid.

A 9625/2012 helyzetét a filogenetikai törzsfán teljes hosszúságú ORF5 szekvencia alapján határoztuk meg. A törzsfa-rekonstrukció eredménye alapján az 1-es genotípuson belül, az 1-es szubtípus „D” kládjába tartozott, azonban a kládon belül egy korábban ismeretlen evolúciós ágat képviselt (4. ábra). A legnagyobb hasonlóságot Spanyolországból leírt izolátummal és élő vakcinával (MLV-vel) rokon törzsekkel mutatta, amelyek már évtizedek óta kimutathatók Magyarországon (Balka et al., 2008).



**4. ábra:** Teljes ORF5 génszekvencián alapuló PRRSV törzsfa-rekonstrukció. A rekonstrukciónál a neighbour-joining módszert használtuk. A törzsfát a megjelenítéshez a VR-2332 segítségével gyökerezítettük. A bootstrap értékeket a fa elágazásainál tüntettük fel és 1000 mintavételre vonatkoznak (%-ban megadva). A 9625/2012 törzs helyzetét a fán piros ponttal jelöltük be.



Az 9625/2012 származtatott aminosav szekvenciáját a legnagyobb egyezést mutató két törzshöz, az Amervac MLV-hoz és az Olot/1991-hez illesztettük. Az eredményeink alapján az nsp1 (9% eltérés az aminosavszerkezeten mindkét törzstől) és nps2 fehérje (7% eltérés) tartalmazta a legtöbb aminosav változást. A neutralizáló ellenanyagok hatását a vírus szekvenciájára a három törzs GP2, GP3, GP4 és GP5 szerkezeti fehérjéinek összehasonlító elemzésével állapítottuk meg, mivel ezek a fehérjék tartalmazzák a neutralizáló ellenanyagok fő célpontjait.

A GP2 fehérjén két ismert neutralizáló epitóp található, az antigénrégió (AR)<sub>33-48</sub> és az AR<sub>117-128</sub> (Oleksiewicz et al., 2002; Vanhee et al., 2011). Az előbbiben kettő, addig az utóbbiban egy aminosav cserét figyeltünk meg. A nem-neutralizáló epitópokban, az AR<sub>1-12</sub>-ben és az AR<sub>89-100</sub>-ben két-két aminosav változást találtunk, míg az AR<sub>201-212</sub> teljesen konzervatívnak bizonyult. A fehérje nem antigénként viselkedő részében összesen öt változás történt (5/A ábra).

A GP3-on két neutralizáló epitóp helyezkedik el (Oleksiewicz et al., 2000; Vanhee et al., 2011). Az AR<sub>53-68</sub>-n kettő, addig az AR<sub>245-256</sub>-on három darab aminosav cserét figyeltünk meg. A nem neutralizáló epitópon (AR<sub>70-88</sub>) összesen egy aminosav változás lokalizálódott (5/B ábra).

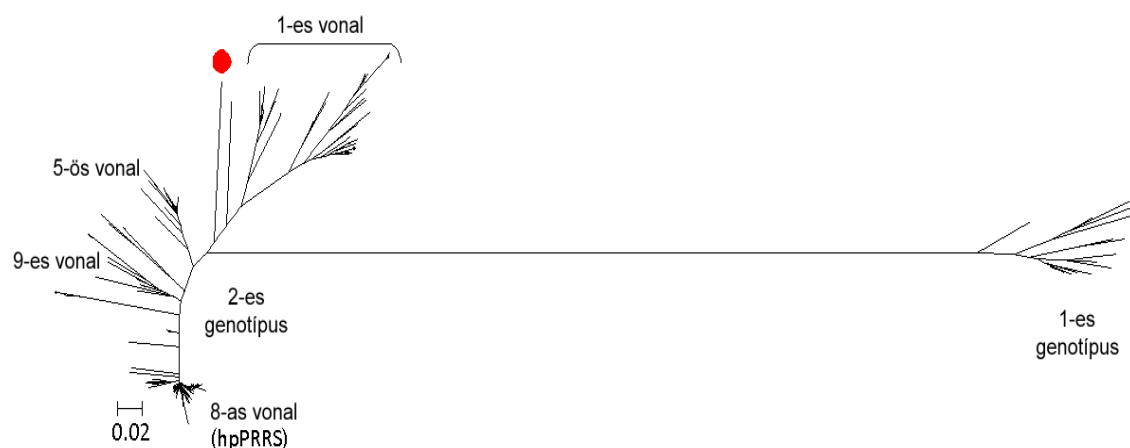
A GP4-n elhelyezkedő egyetlen ismert B-sejt epitópnak (Meulenbergh et al. 1997; Vanhee et al., 2011), az AR<sub>57-68</sub>-nak a szekvenciája variábilis, négy darab szubsztitúciót azonosítottunk, addig a szekvencia többi, nem immunogén részében csak három változást figyeltünk meg (5/C ábra).

A GP5-ön egy ismert neutralizáló epitóp (AR<sub>29-35</sub>) található (Wissink et al., 2003), amelyen összesen egy aminosav cserét észleltünk. Ezen kívül még négy epitóp helyezkedik el a fehérjén, ebből kettő teljesen konzervált (AR<sub>161-179</sub>, AR<sub>189-201</sub>), másik kettő (AR<sub>37-45</sub>, AR<sub>145-156</sub>) egy-egy darab szubsztitúciót tartalmazott (5/D ábra). Az Amervac MLV GP5-jéhez hasonlóan három N-glikozilációs hely (N37, N46, N53) található a 9625/2012-n. Az N37 azt jelenti, hogy a fehérje 37. pozíciójában levő aszparaginhez egy glikán kapcsolódhat. Az aminosav változások nagy hányada a GP2, GP3 és GP4 antigénrégióiban történt, ebből arra következtettünk, hogy az immunrendszer által gyakorolt szelekciós nyomásnak fontos szerepe lehetett a vírus szekvenciájának változásában.



## 6.1.2 PRRSV-2/Hungary/102/2012 törzs genomja és filogenetikai elemzése

A PRRSV-2/Hungary/102/2012 (102HU) szekvenciájának hossza teljes genom összeillesztését követően 15321 nukleotidnak bizonyult. A GenBank adatbázisába KM514315 azonosítószámmal került be. A nem transzlálódó (UTR) 5' és 3' végek 189 és 151 nukleotid hosszúak voltak. Az 5' UTR rész a PRRSV DK-2003-2-3 törzs 5' UTR szekvenciájától 12 nukleotidban tért el, addig a 3' UTR régió mindösszesen 4 nukleotidnyi eltérést mutatott a PRRSV DK-2004-1-7-PI ugyanazon régiójához képest. A teljes genomszekvencián alapuló összehasonlító vizsgálatba 215 darab szekvenciát vontunk be (6. ábra). A genomszekvenciák összehasonlítása alapján a 102HU egy teljesen új, 2-es genotípusú PRRSV törzs, amely nem mutat közeli rokonságot sem a VR-2332, sem az Ingelvac PRRSV MLV élő vakcina törzssel (5-ös vonal tagjai). A legnagyobb szekvenciabeli hasonlóságot a VR-2385 izolátummal mutatta, a két izolátum között 13%-nyi különbséget azonosítottunk.



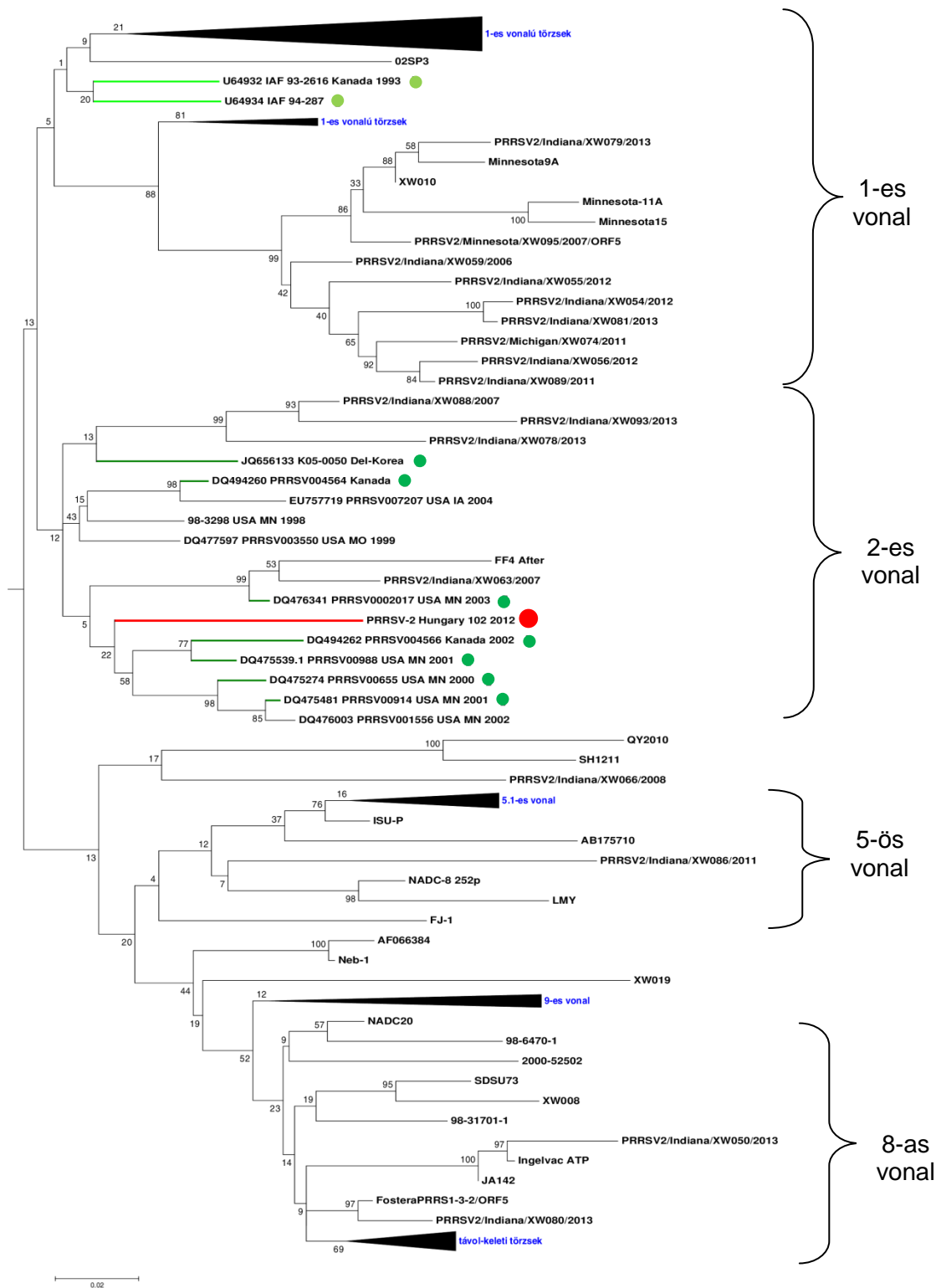
**6. ábra:** A teljes PRRSV genomszekvencián alapuló, maximum likelihood módszerrel készült filogenetikai törzsfa-rekonstrukció. A törzsek vonalakba sorolása Shi et al. (2010b) cikkén alapul. Piros pont jelöli a PRRSV-2/Hungary/102/2012 törzset. A VR-2332, a VR-2385 és az Ingelvac PRRSV az 5-ös vonalba tartozik. A hpPRRS az erősen patogén kínai törzseket jelöli.

A teljes ORF5 szekvenciák alapján felállított filogenetikai törzsfá a 102HU-t a 2-es genotípuson belüli 2-es vonalba helyezte (7. ábra). A tőle legkisebb filogenetikai távolságra levő GenBankból gyűjtött szekvenciáktól 8-9%-ban tért el. Sötétzöld színnel jelöltük a 7. ábrán a 92% egyezést mutató izolátumokat. A törzsek többségét a 2000-es évek elején izolálták az Egyesült Államokban, de azonosítottunk köztük egy 91% egyezést mutató 1993-ból származó kanadai PRRSV-t is, az IAF 93-2616-ot (4. táblázat). A 102HU-val legalább 91% egyezést mutató szekvenciák az 1-es és a 2-es vonalba tartoztak. Ebből arra következtettünk, hogy a 102HU a két vonal szétválási pontjához közel helyezkedhet el a filogenetikai törzsfán.

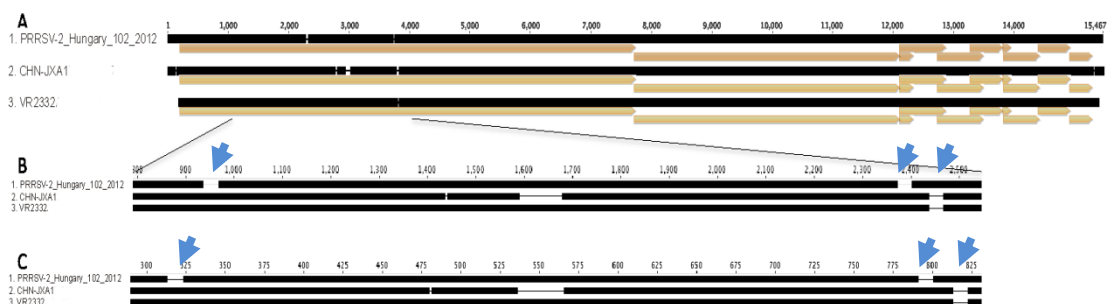
Az eddig ismert összes teljes PRRSV szekvenciát bevontuk a rekombináció elemzésbe, azonban nem találtunk arra bizonyítékot, hogy a 102HU törzs ismert szekvenciák rekombinációjából jött volna létre.

A nukleotid szekvencia elemzése után az izolátumot aminosavszinten vizsgáltuk, hogy megállapítsuk, milyen egyedi mutációkat és változásokat hordoz (8A ábra). A 102HU-val a legnagyobb szekvenciabeli egyezést mutató VR-2385 az nsp2 régióban egy 400 nukleotidnál is hosszabb deléciót hordozott. Ez a deléció nem a VR-2385 törzs egyedi tulajdonsága, több izolátumnál is megfigyelhető. A régió elemzéséhez olyan törzseket választottunk, amelyek a szekvenciahosszban minimális eltérést mutattak a vizsgált izolátumhoz képest. Az nsp2-ben két deléciót fedeztünk fel; egy 10 aminosavast és egy 9 aminosavast, amelyek nem találhatók meg sem a VR-2332 prototípustörzsből (314-323 és 795-803 közötti aminosavak deléciója történt), sem a magasan patogén kínai prototípustörzsből, a JXA1-ben. Ezzel szemben találtunk egy inzerciót az nsp2-ben 795. és 803. aminosav pozíciók között, amely a korábban tárgyalt másik két törzsből hiányzott (8B és 8C ábra).

Összehasonlítottuk és részletesen elemeztük a glikozilációban és az antigénrégiókban történő aminosav változásokat a GP2, GP3, GP4 és GP5 fehérjéken belül. A referenciatörzseknek a VR-2332-öt, Ch-1a-t és az NVSL 97-7895-öt választottuk, mivel az antigénrégiókat érintő tanulmányok többségét ezen a három vírustörzsön végezték.



**7. ábra:** PRRSV-2/Hungary/102/2012 elhelyezkedése (piros folt) a teljes ORF5 szekvencia alapján készült törzsfarekonstrukción. Sötétzöld jelöli a 92% egyezést mutató izolátumokat, világoszöld mutatja korai kanadai törzseket (91% egyezés). A bootstrap értékeket a fa elágazásainál tüntettük fel, és 1000 mintavételre vonatkoznak (%-ban megadva). Kék színű feliratok jelölik a törzsfarekonstrukciónak azt a részét, melyet MEGA programmal összesűríttünk.



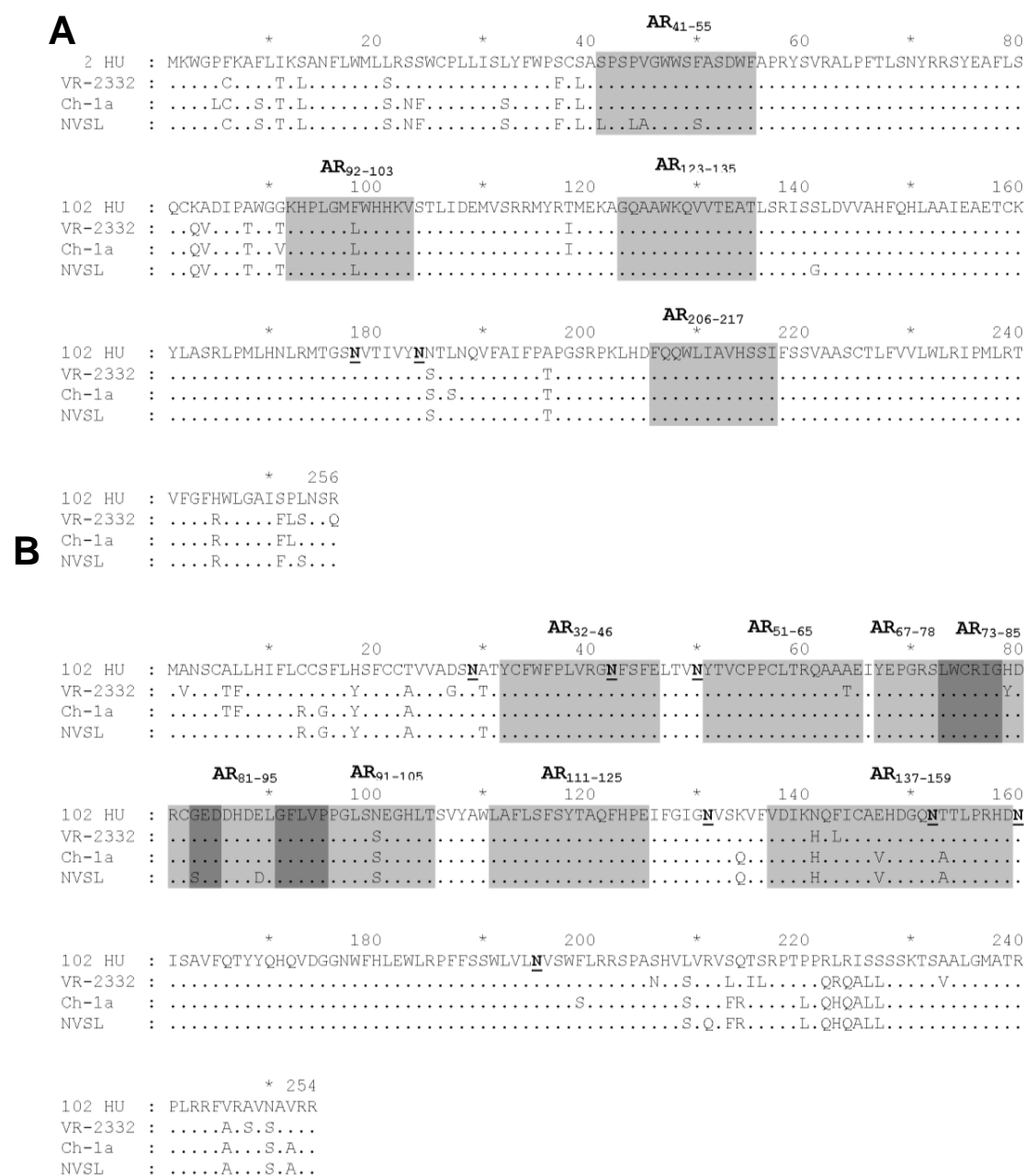
**8. ábra:** PRRSV-2/Hungary/102/2012 törzs inzerció és deléció elemzése. Referenciatörzseknek a 2-es típusú VR-2332 és a kínai erősen patogén JXA-1-et választottuk. (A) Teljes genom vázlatos ábrázolása (B) az nsp2 nukleotid szekvenciájában található deléciók és inzerciók (C) deléciók és inzerciók elhelyezkedése (kék nyilak) az nsp2 aminosav szekvenciájában.

A GP2 fehérjén legalább négy darab B-sejt epitóp vagy antigénrégió (AR) lokalizálódik. Az AR<sub>41–55</sub> és AR<sub>123–135</sub> epitóp jellegét mindkét genotípusban megerősítették, addig az AR<sub>92–103</sub>, és az AR<sub>206–217</sub> epitóp tulajdonságait csak az 1-es genotípusban vizsgálták (Lima et al., 2006; Vanhee et al., 2011). Az AR<sub>92–103</sub>-ben egyetlen aminosav csere történt, addig AR<sub>123–135</sub>-ön és AR<sub>206–217</sub>-en nem figyeltünk meg aminosav változást. Az NVSL 97-7895 és a 102HU között az AR<sub>41–55</sub>-ben négy aminosav pozícióban fedeztünk fel különbséget. A GP2-ön két N-glikozilációs hely található (Das et al., 2011), bár néhány aminosavnyi különbséget megfigyeltünk a 102HU-ban a felismerőhelyen, az N-glikozilációs hely pozíciója minden vizsgált törzsben megegyezett (9/A ábra).

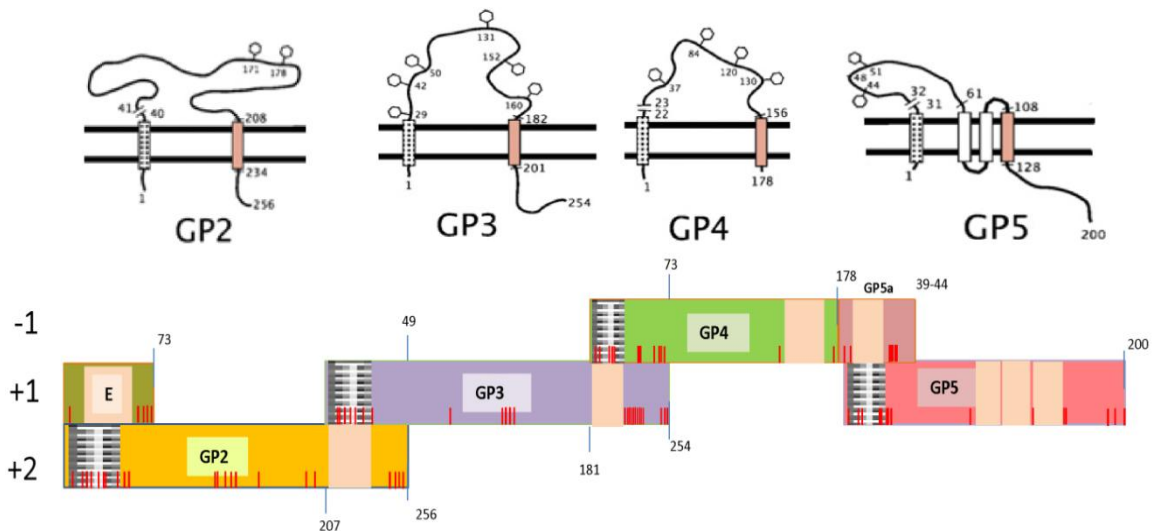
A GP3 fehérjén legalább négy, kísérletesen bizonyított antigénrégió (AR<sub>32–46</sub>, AR<sub>51–105</sub>, AR<sub>111–125</sub>, AR<sub>137–159</sub>) helyezkedik el (Lima et al., 2006; Zhou et al., 2006; Wang et al., 2014). Az AR<sub>51–105</sub> legalább öt darab egymással is átfedő B-sejt epitópból (AR<sub>51–65</sub>, AR<sub>67–78</sub>, AR<sub>73–85</sub>, AR<sub>81–95</sub>, AR<sub>91–105</sub>) épül fel. Az aminosav szekvencia összehasonlítás során ebben a régióban mindössze öt darab aminosav változást figyeltünk meg. Az AR<sub>32–46</sub>-ot és AR<sub>111–125</sub>-öt teljesen konzervatívnak találtuk, a negyedik régió, az AR<sub>137–159</sub> variábilisnak bizonyult, négy darab aminosav szubsztitúciót azonosítottunk benne a referenciatörzsekhez képest (9/B ábra).

Jóllehet, a mutációk többsége nem epitópon lokalizálódik, de az elhelyezkedésük mégsem véletlenszerű. A fehérjék ORF-jeinek lokalizálódását vizsgálva megfigyeltük, hogy a GP2 transzmembrán (TM) régióját kódoló szakasz átfed a GP3 szignálpeptidjét kódoló szekvenciával, és hasonló kapcsolat található a GP3 és a GP4 közt is. A mutációk többsége a GP3-ban a szignálpeptidben és a GP4-gyel átfedő, TM régió utáni

C-terminális végen található, valamint az átfedés miatt a GP4 N-terminális végénél (10. ábra). Hét darab N-glikozilációs helyet azonosítottunk, amelyek elhelyezkedése a szekvencián megegyezett a referenciatörzsek N-glikozilációs helyeivel (Das et al., 2011) (9/B ábra).



**9. ábra:** (A) ORF2, (B) ORF3 származtatott aminosav szekvenciájának illesztése. Az antigén régiókat szürkével, az átfedő antigén régiókat sötétszürkével jelöltük. A glikozilációs helyeket aláhúzott, félkövér betűtípussal emeltük ki.



**10. ábra:** Az egymással átfedő szerkezeti fehérjék ORF-einek vázlatos ábrázolása (Dokland, 2010). Piros vonalak mutatják azokat a helyeket, ahol a PRRSV-2/Hungary/102/2012 legalább két referenciatörzstől eltér. A szignálpepidet sávozottan, a TM hélixet narancsszínnel jelöltük.

A GP4-en a korábbi kutatások két T-sejt és egy B-sejt epitópot írtak le. Az AR<sub>51-65</sub> egy ismert hipervariábilis régió (Díaz et al., 2009; Lima et al., 2006), a referenciatörzsekhez képest öt darab aminosav változást figyeltünk meg. A kilenc aminosav hosszúságú T-sejt epitóp 7-15-ön (Tce<sub>7-15</sub>), amely egy fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) II által felismert régió, három aminosavnyi eltérést azonosítottunk. A Tce<sub>170-178</sub>-ban, amely egy MHC I által felismert epitóp, a vizsgált törzs két aminosavban tért el a referenciatörzsektől. A referenciatörzsekhez képest (Das et al., 2011) a PRRSV-2/Hungary/102/2012-ben eggyel több, összesen öt darab N-glikozilációs helyet találtunk. Az ötödik hely az AR<sub>51-65</sub>-n helyezkedett el (11/A ábra).

A GP5-ön legalább hat darab B-sejt epitóp lokalizálódik (Lima et al., 2006; Ostrowski et al., 2002; Plagemann et al., 2002; Thaa et al., 2013; Zhou et al., 2009). Az N-terminális végen elhelyezkedő AR<sub>1-15</sub> és AR<sub>27-35</sub> szekvenciája variábilisnak, addig a többi négy régió (AR<sub>37-51</sub>, AR<sub>149-156</sub>, AR<sub>166-181</sub>, AR<sub>192-200</sub>) konzervatívnak bizonyult. Az utóbbi négy régióban a PRRSV-2/Hungary/102/2012 legfeljebb egy aminosavban különbözött a referenciatörzsektől. A GP5 fehérjén elhelyezkedő három T-sejt epitóp (Díaz et al., 2009; Vashisht et al., 2008; Mokhtar et al., 2014), a Tce<sub>115-126</sub>, Tce<sub>60-74</sub> és Tce<sub>149-163</sub> szekvenciája konzervált. A GP5 fehérjén öt darab potenciális N-glikozilációs helyet találtunk. Két hely, az N44 és az N57 az AR<sub>37-51</sub> régióban, a másik három hely az erősen változó AR<sub>27-35</sub>-ön helyezkedett el (11/B ábra).

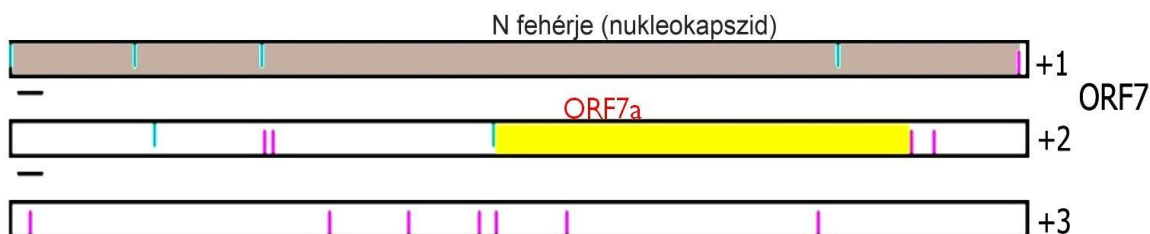




## 6.2 A PRRSV ORF7 alternatív leolvasási keretéről leíró peptid immunológiai és biokémiai jellemzése

### 6.2.1 Alternatív ORF-ek azonosítása a genomban

Az ORF Finder tool programmal (Tatusov, T. és Tatusov, R., 2011) 46 darab, egymástól eltérő PRRSV törzs nukleotid szekvenciáját vizsgáltuk, hogy a genomban alternatív ORF-eket azonosítsunk. Mindegyik vizsgálatba vont törzsnél az ORF7-en belül azonosítottunk egy alternatív nyitott leolvasási keretet. A talált ORF-ek származtatott aminosav szekvenciáit összeillesztettük, hogy tanulmányozzuk a hipotetikus peptid konzerváltságát. Az elemzésünk egy jól konzervált ORF-et tárt fel a nukleokapszid fehérjét kódoló ORF7-en belül. Ezt a rövid ORF-et, ORF7a-nak neveztük el. Az ORF7a +2-es leolvasási keretben helyezkedett el, és teljesen átfedett a nukleokapszid génnel (12. ábra). A róla leíró potenciális fehérjeterméket 7ap-nek neveztük el, amelynek szekvencia hosszúsága genotípustól függően 26 és 53 aminosav között volt, öt teljesen konzervált és tizenkét részlegesen konzervált aminosavat tartalmazott (13. ábra). A különböző törzsekről leíró 7ap-k eltérő fizikai-kémiai tulajdonságokat mutattak, azonban az összesre jellemző, hogy semleges pH-n a bázikus aminosavak túlsúlya miatt pozitív töltéssel rendelkeznek.



**12. ábra:** A HU-14432/2011 PRRSV törzsben (4. táblázat) a nukleokapszidot kódoló ORF7 gén három leolvasási keretének vázlatos ábrázolása. A vizsgált ORF-et sárga színnel jelöltük. +1 leolvasási keret a nukleokapszidot, a +2 leolvasási keret az ORF7a-t kódolja.

### 6.2.2 A 7ap transzlációja és lokalizációjának meghatározása fúziós konstrukciókkal

A legegyszerűbb magyarázat az ORF7a konzerváltságára és a különleges fizikai-kémiai tulajdonságaira, hogy fehérje íródik le róla. A 7ap transzlációjának bizonyítása céljából eGFP fúziós fehérje konstrukciókat hoztunk létre. Az ORF7 génből három konstrukciót készítettünk (14/A ábra), pozitív kontrollként az N fehérjét az eGFP leolvasási keretéhez fuzionáltuk, negatív kontrollként ahhoz a leolvasási kerethez

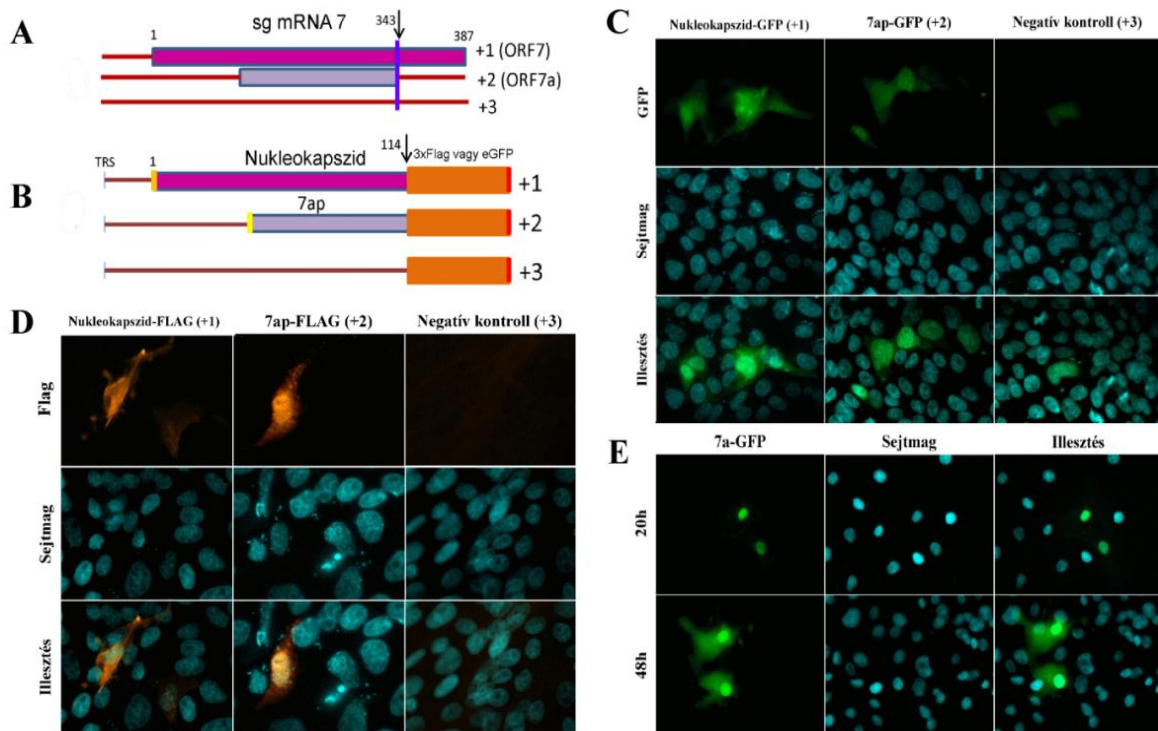
kapcsoltuk az eGFP riportergént, amelyben nincsen ORF (14/B ábra). A harmadik konstrukciónál a hipotetikus 7ap-t kódoló leolvasási keretet egyesítettük az eGFP fehérjével. A konstrukciókat PT sejtbe transzfektáltuk, majd 48 óra után a sejteket fixáltuk, és mikroszkópos vizsgálattal kiértékeljük az eredményt. A nukleokapszid-eGFP fúziós fehérjét kódoló pozitív kontrollnál erőteljes zöld fluoreszcens jelet tapasztaltunk. A +2-es leolvasási kerethez kapcsolt eGFP konstrukció is pozitívnak bizonyult, az észlelt fluoreszcens jel intenzitása alacsonyabb volt a pozitív kontrollhoz képest. A negatív kontrollnál is megfigyeltünk egy gyenge zöld fluoreszcens jelet (14/C ábra).

	*****	*	*****	* * * *	***	*****	***	***	*	***
HKEU16	MTSGTISPRP	SAPSACNRF	RLSIKAQELR	RFHPVGRSVF	RLSSCCRLLI	QCA				
KNU-07	MTSGITSPRL	NVPSACNRSR	RLSIKAQELR	RFHPVGRSVF	RLSSCCRLLI	QCA				
SD01-08	MTSGTISPKL	NAPSACNRSR	RLSIKAQELR	RFHPAGRSVS	RLSLCCRLLI	QCA				
BJEU06-1	MTFGIISPTL	NAPSVCNRSR	RLSIKAQELR	RFHPVGRSVF	RLSLCCRLLI	QCA				
NMEU09-1	MMSGITSPRP	SVLFACNRF	RLSIKVELER	RFRPVGRSVF	RSSSCCRLII	QCA				
Amevvac	MTFGTISPRP	NVPSACNRSR	RLLIKAQELR	RFHPAGRSVF	RLSSCCRLLI	QCA				
SHE	MTFGTISPRP	NVPSACNRSR	RLLIKAQELR	RFHPAGRSVF	RLSSCCRLLI	QCA				
Lelystad	MTSGTISPRP	NAPSACNRSR	RLSIKAQELR	RFHPAGRSVF	RLSLCCRLLI	QCA				
HU-14432/2011	MTSGTISPRP	NAPSACNRSR	RLSIKAQELR	RFHPAGRSVF	RLSLCCRLLI	QCA				
01CB1	MTSGTISPRP	NAPSACNRSR	RLSIKAQELR	RFHPAGRSVF	RLSLCCRLFI	QCA				
07v063	MTFGTISPRP	SAPSACNRSR	RPSIKAQELH	RFHPVGRSVF	RLSSCCRSII	QCA				
IV3140	MMSGTISPRP	SAPFACNRSR	RLLIKARELR	RFHPAGRSVF	RLSLCCRLLI	QCA				
Lena	MMSGTISPEL	NVPSVCNRSR	QPLIRVQELR	RFHPAGRSVF	RLSLCCRSII	QCA				
Soz-8	MMSGTISHKL	NVLFACNRSR	PPLTRVQELR	RFRTAGRSVF	RLSSCCRSII	QCA				
Obu-1	MMSGTISPEL	NVPSVCNRSR	QPLTRVQELR	RFHPVGRSVF	RLSLCCRSII	QCA				
Yuz-48	MMSGTISPKL	NVLSACNRSR	RPSTRAQELR	RFHLAGRSVF	RLSLCCRSII	QCA				
Zap-41	MMSGTISPKL	NVLFVCNRSR	QPSTKAQELR	RFHPVGRSVS	RLSLCCRSII	QCA				
Vos-29	MMSGTISPKL	NVLFVCNRSR	QPSTKAQELR	RFHPAGRSVS	RLSLCCRSII	QCA				
Aus	MTSGITSPRL	NVPSVCNRSR	QPSIRVQELH	RFHPVGRSVF	R					
Pyrsvac-187	MTFGTISPRP	NVPSACNRSR	RLLIKAQELR	RFHPAGRSVF	RLSSCCRLLI	QCA				
Upa-13	MTSGTISPRP	NAPFACNRSR	RLSIKA							
Dzi-64	MTFGTISPRP	SVPFACNRSR	RPLIKAQELH	RFHPVGRVLF	RLSLCCRLLI	QCA				
Che-46	MTFGTISPKP	NVPFACNRSR	QPLIKVQELR	HFHPVGRSVF	RWSSCCRLLI	QCA				
Vas-3	MTFGITSPQL	SVPFVCNRSR	QPSIRAQELR	RFHPVGRSVF	R					
Zad-39	MMSGTISPEL	NVPSVCNRSR	QPLIRVQELR	RFHPAGRSVF	RLSLCCRSII	QCA				
Sno-6	MTSGIISPOL	SVLFVCNRSR	QPLIRVPGLH	RFHLAGRSVF	RWSSCCRLII	QCA				
WUH4	MTSGITLPLV	SGNCVCRRSR	LPSIRVLELV	PCQIQGG						
VR-2332	MMSDITLPLV	SGNCVCRRSR	PPLIKALGLA	PCQIQGG						
MN30100	MTSDITLPLV	SGNCVCRRSR	LLLIKALELA	PCQIQGG						
NVD-JS2-2011	MTSGITLPLV	SGNCVCRRSR	LPSIRALELV	PCQIQGG						
NVSL 97-7985	MTSDITLPLV	SGNCVCRRSR	LPLIKALELA	PCRIQGG						
CH-1a	MTSGITSPLV	SGNCVCRRSR	LPLTRAPELV	PCQIQGG						
Hawkeye	MTLDITSPLV	SGNCVCRRSR	LPLTKALELV	PCRIQGE						
Flagship	MTLDITSPLV	SGNCVCRRSR	LPLTKALELV	PCRIQGE						
JA-142	MTSGITSPLV	SGNCVCRRSR	LPLTRAPELV	PYQIQVG						
Yn-2011	MMSDITLPLV	SGNCVCRRSR	PPLIKALGLA	PCQIQGG						
A2MC2	MMSDITLPLV	SGNCVCRRSR	PPLIKALGLA	PCQIQGG						
MN184B	MTLDITSPLV	SGNCVCRRSR	LPLTKALELV	PCRIQGE						
SDSU73	MTSDITLPLV	SGNCVCRRSR	LPLIKALELA	PCRIQGG						
P129	MTSGITSPLV	SGNCVCRRSR	LPLTRAPELV	PCQIQGG						
17198-6	MTLDITSPLV	SGNCVCRRSR	LLLIKALELA	PCQIQGG						
CA	MMSDITLPLV	SGNCVCRRSR	PPLIKALGLA	PCQIQGG						
05K212	MTSDITLPLV	SGNYVCRRSR	LPLTKALELA	PCQIQGE						
PL97-1/LP1	MMSDITLPLV	SGNCVCRRSR	PPLIKALGLA	PCQIQGG						
JXwn06-81c	MTSGITLPLV	SGNCVCRRSR	LPSIRALELV	PCQIQGG						
SX-1	MTSGITLPLV	SGNCVCRRSR	LPSIRALELV	PCQIQGG						
	*****	*****	* * * *	**	*****					

1-es típus

2-es típus

**13. ábra:** ORF7a származtatott aminosav szekvenciáinak illesztése. Piros színnel a konzervált aminosavak. Kék színnel részlegesen konzervált pozíciók. Lila szín jelöli az 1-es genotípusban, zöld szín a 2-es genotípusban konzervált aminosavakat.



**14. ábra:** A 7ap fúziós fehérjék felépítése és transzlációja. (A) Az sg-mRNS 7 három leolvasási keretének vázlatos ábrázolása. A nukleokapszid génjét a 343. nukleotid pozícióban csonkultuk, ahol a vele átfedő ORF7a gén végződik. (B) A 3xFLAG-et és az eGFP-t a nukleokapszid fehérje 114. aminosavával egyesítettük. A riporter gént a 7ap peptid utolsó aminosavával fuzionáltattuk. (C) eGFP transzlációja a fúziós konstrukciókról és lokalizációja a PT sejtekben. (D) 3xFlag transzlációja a fúziós konstrukciókról és lokalizációja a PT sejtekben. (E) A 7ap-eGFP fúziós fehérje sejtbeli lokalizációjának változása időben nyomon követve. Az idő, a transzfekció után eltelt időt mutatja.

A negatív kontrollnál látott fluoreszcens jel az eGFP saját startkodonjáról történő iniciáció következménye lehetett. Az eGFP-s konstrukciókkal kapott eredményt megerősítendő, az ORF7 minden leolvasási keretét 3xFLAG riporterpeptidhez kapcsoltuk. A kapott plazmidokat PT sejtbe transzfektáltuk, és 48 óra elteltével kiértékeljük az eredményt. A FLAG-fúziós fehérje leíródását indirekt immunfluoreszcenciával a +1-es és +2-es leolvasási keretre tervezett konstrukciónál is kimutattuk (14/D. ábra).

Ahhoz, hogy a 7ap lokalizációját a sejtekben biztosan fluoreszcens háttér nélkül vizsgáljuk, készítettünk egy olyan változatot a pEGFP-N1 plazmidból, amelyben az eGFP startkodonját ATG-ről (metionin) GCG-re (alanin) változtattuk (M1AeGFP-N1). A mutáció megakadályozta az eGFP startkodonjának inicializálását, így a negatív kontroll

esetében nem kaphattunk fluoreszcens jelet. Az ORF7a génjét az elmutáltatott eGFP-hez kapcsoltuk. 16-20 órával a transzfekció után a 7ap a sejtmagban lokalizálódott, de 48 óra múlva az egész sejtben észleltük az 7ap-eGFP fehérje jelenlétét (14/E. ábra). Eredményeink alapján a 7ap 20 óra után sejtmagban lokalizálódik, majd 48 óra múlva a sejt citoplazmájában is kimutatható.

### 6.2.3 A 7ap IgG kötő képessége és a komplementkötés gátlása

Ha a fertőzés során leíró 7ap immunogén tulajdonságú, akkor ellene a sertés szervezetében antitestek termelődhetnek. A PRRSV fertőzésen átesett állatok szérumból szerológiai vizsgálatokkal terveztük kimutatni a 7ap elleni antitesteket.

Két egymástól eltérő vektorba, a pet28b-be (Merck KgaA, Darmstadt, Németország) és pBAD2TEV-be (Zádori et al., 2001) klónoztuk a HU-14432/2011 törzsből a 7ap gént. A választást az indokolta, hogy rendelkezésünkre állt több HU-14432/2011 a törzssel fertőzött állat széruma és szekvenciája 99% egyezést mutat a referencia Lelystad törzssel. A létrehozott expressziós vektorokkal *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  sejteket transzformáltunk. Mindkét expressziós vektorról leíró fehérje toxikusnak bizonyult baktériumokra nézve, a 7ap tisztítása többszöri próbálkozás ellenére is sikertelen maradt.

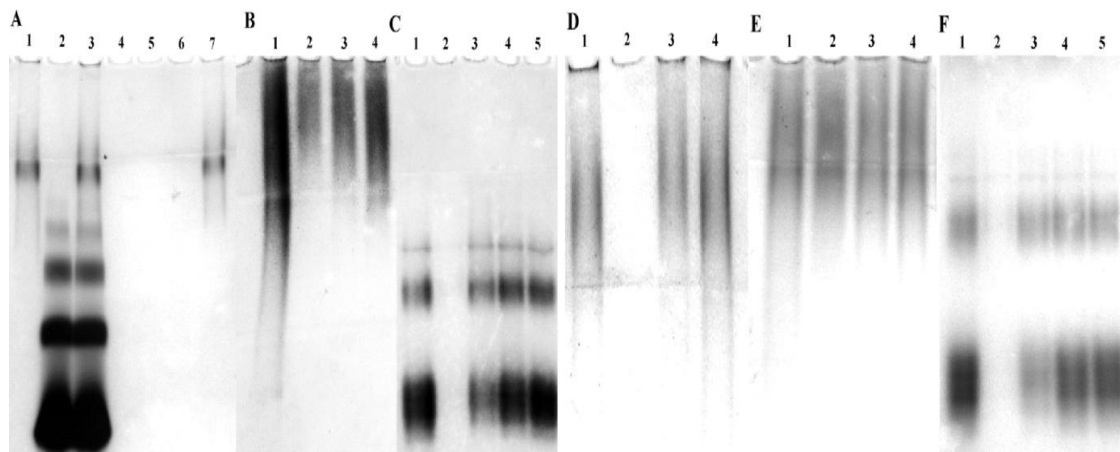
A sikertelen expressziós kísérletek után a HU-14432/2011-ből származó 7ap peptidet kémiai úton megszintetizáltattuk, és ELISA lemezt vontunk be vele. A PRRSV pozitív szérumok négy darab, intranazálisan HU-14432/2011 törzssel fertőzött vemhes kocától származtak. Az állatok szérumát INGEZIM PRRS Universal kittel vizsgáltuk és még 1000-szeres hígításban is pozitív eredményt adtak. Az indirekt ELISA tesztben az egyik negatív kontroll egy PRRSV negatív állat széruma volt, a másik az ELISA lemez azon része, amelyhez nem adtunk elsődleges ellenanyagot. Ezzel ellenőriztük, hogy a HRP vagy a másodlagos ellenanyag nem lép-e kölcsönhatásba a 7ap peptiddel. Eredményeink alapján nemcsak a PRRSV pozitív állatok széruma, hanem a PRRSV negatív mintával kezelt lyukak is pozitívnak bizonyultak, továbbá szérumot nem tartalmazó, de másodlagos ellenanyaggal kezelt részek is magas fényelnyelési értéket (OD) adtak. Ebből arra következtettünk, hogy legalább egy, aspecifikus antigén felismerőhely található a 7ap peptiden, amely független az ellenanyag antigénkötő tulajdonságától. Ahhoz, hogy a 7ap aspecifikus ellenanyag-kötő képességét bizonyítsuk, több különböző állatból származó IgG és 7ap kölcsönhatását vizsgáltuk ELISA tesztel. Az eredményeink alapján a Hu7ap erősen köti az összes vizsgált emlősből (sertés, egér, kecske, nyúl) származó IgG-t és ez a kötődés teljesen független a HRP-től (9. táblázat).

	1000x	2000x	4000x	8000x	1000x 7ap nélkül
<b>Kecske anti-csirke IgG-HRP</b>	++	+	+/-	-	-
<b>Kecske anti-sertés IgG-HRP</b>	+++	++	+	+	-
<b>Sertés anti-nyúl IgG-HRP</b>	+	+	+/-	-	-
<b>Nyúl anti-sertés (Fab')<sub>2</sub>-HRP</b>	++	+	+/-	-	-
<b>Egér monoklonális-HRP</b>	++	+	+	+/-	-
<b>HRP</b>	-	-	-	-	-

**9. táblázat:** A különböző állatfajokból származó IgG-k reakciója a 7ap fehérjével. Az ELISA tesztben az 1,6-nél nagyobb OD értékeket három pluszjellel (+++), az 1,59-0,8 közötti értékeket két pluszjellel (++), a 0,79-0,4 közötti OD értéket egy pluszjellel (+) jelöltük. A 0,39-0,2 közötti értékeket (+/-) jelöltük. A 0,19 alatti értékeket negatívnak (-) vettük.

A fehérje-fehérje gél retardációs teszttel terveztük megerősíteni (Park és Raines 2004) az ELISA-val kapott eredményeket és meghatározni a 7ap kötőhelyét az IgG fehérjén. A tesztbe egy 2-es genotípusból (WuH4) származó 7ap peptidet (Wu7ap) is bevontunk. Semleges pH-n mind a Hu7ap és a Wu7ap pozitívan töltött (izoelektromos pontja az előbbinek 11,7 az utóbbinak 9,3), emiatt, ellentétben az IgG-vel és annak fragmentjeivel, natív (nem denaturáló) körülmények között nem fut bele a gélbe, hanem a pufferben a negatív elektróda felé vándorol. A pozitívan töltött 7ap és az IgG és annak fragmentjei közötti kölcsönhatás azt eredményezheti, hogy a kialakult komplex a megnövekedett méret és a csökkenő negatív töltöttség miatt nem tud a gélbe lépni.

Az eredményeink azt mutatták, hogy 4 µg-nyi a Hu7ap-ból és 20 µg-nyi a Wu7ap-ból teljesen blokkolta 10 µg monoklonális egér IgG futását a gélben. Hasonló hatást 10 µg poliklonális sertés IgG esetében 8 µg Hu7ap és 40 µg Wu7ap ért el. (15/A és 15/D ábra). Kötőhelyének azonosításához a 7ap kölcsönhatásait vizsgáltuk különböző IgG fragmentekkel (az IgG (Fab')<sub>2</sub> és az IgG Fc). A nagy mennyiségben (50 µg) hozzáadott 7ap sem blokkolta teljesen a sertés poliklonális IgG (Fab')<sub>2</sub> gélben futását (15/B és 15/E ábra), míg 16 µg Hu7ap és 32 µg Wu7ap gátolta 10 µg sertés poliklonális IgG Fc gélbe lépését (15/C és 15/F). Ezek a kísérletek azt mutatták, hogy a 7ap peptidek genotípustól függetlenül képesek a sertés poliklonális és az egér monoklonális ellenanyag kötésére, és a fő kötőhely az IgG Fc részén található.



**15. ábra:** Ellenanyag-7ap retardációs teszt. (A) Monoklonális IgG és 7ap kölcsönhatása. 1-3. sáv a negatív kontroll. 1. sáv: 10 µg IgG; 2. sáv: 80 µg BSA; 3. sáv: IgG+BSA; 4-7. sáv: 10 µg egér IgG+Hu7ap felező hígításban (16 µg, 8 µg, 4 µg és 2 µg).

(B) Poliklonális sertés IgG (Fab')<sub>2</sub>-Hu7ap kölcsönhatása. 1. sáv: 8 µg IgG (Fab')<sub>2</sub>; 2-4. sáv: 8 µg IgG (Fab')<sub>2</sub>+ Hu7ap felező hígításban (32 µg, 16 µg, 8 µg).

(C) Poliklonális sertés IgG Fc rész-Hu7ap kölcsönhatása. 1. sáv: 10 µg IgG Fc; 2-5. sáv: 10 µg IgG Fc+Hu7ap felező hígításban (16 µg, 8 µg, 4 µg, 2 µg).

(D) Poliklonális sertés IgG-Wu7ap kölcsönhatása. 1. sáv: 10 µg IgG; 2-4. sáv: 10 µg IgG+ Wu7ap felező hígításban (20 µg, 10 µg, 5 µg).

(E) Poliklonális sertés IgG (Fab')<sub>2</sub>-Wu7ap kölcsönhatása. 1. sáv: 10 µg IgG (Fab')<sub>2</sub>; 2-4. sáv: 10 µg IgG (Fab')<sub>2</sub>+ Wu7ap felező hígításban (50 µg, 25 µg, 12,5 µg).

(F) Poliklonális sertés IgG Fc rész-Wu7ap kölcsönhatása. 1. sáv: 8 µg IgG Fc; 2-5. sáv: 8 µg IgG Fc+Hu7ap felező hígításban (32 µg, 16 µg, 8 µg, 4 µg).

Újabb kísérleteket terveztünk, hogy az IgG Fc rész szerepét megerősítsük. A staphylococcus protein A (SpA) fehérje az Fc részt a CH3 doménnél köti, addig a komplement rendszer tagjának, a C1q fehérjének a kötőhelye a CH2 és CH3 domén közti részen lokalizálódik. Kompetitív ELISA tesztben nagy mennyiségben hozzáadott 7ap fehérje sem gátolta az spA-HRP kötődését a poliklonális sertés IgG Fc-hez, ám amikor nyúl anti-vörösvértest IgG-hez (hemolizinhez) HU7ap-t és Wu7ap-t adtunk, a Hu7ap gátolta a komplement fehérjék által kiváltott a hemolízist. Ennek magyarázata az lehet, hogy a Hu7ap megakadályozhatta a C1q kötődését az Fc részhez, így a komplement rendszer nem tudott aktiválódni, és a vörösvértestek épen maradtak. Eredményeink alapján a Hu7ap az IgG CH2 doménjával lép interakcióba, és a kötőhelye részben vagy teljesen átfedhet a C1q-jével.

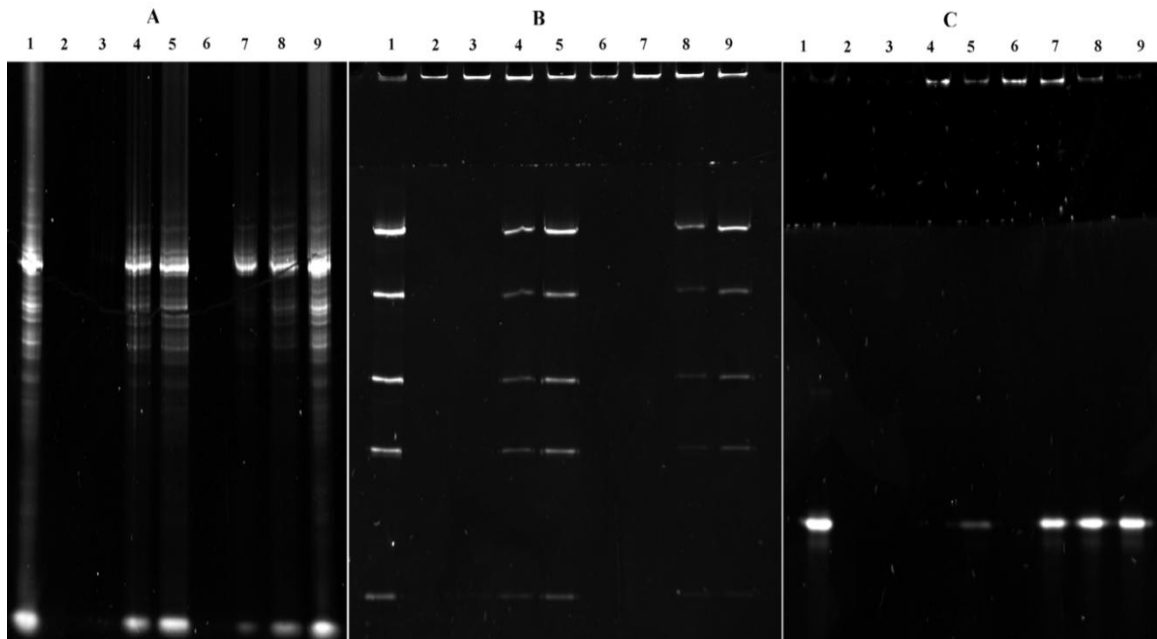
#### **6.2.4 A 7ap nukleinsav kötő tulajdonsága**

Az IgG kötő tulajdonsággal nem magyarázható a peptid baktériumokra gyakorolt toxikus hatása. Ha a tápoldathoz adtuk a 7ap peptidet, sem a baktériumokra, sem az eukarióta sejtekre nem gyakorolt kedvezőtlen hatást, de ha 7ap-t egy plazmidba kódoltuk és ezzel baktériumokat transzformáltuk, akkor a sejtek elpusztultak. A 7ap-hez hasonlóan a nukleinsavkötő fehérjék is pozitívan töltöttek sejten belül. Azt gondoltuk, hogy a nukleinsavhoz való kötődés okozhatta a baktérium sejtek pusztulását. Ahhoz, hogy ezt a hipotézist igazoljuk, nukleinsav-7ap gél retardációs tesztet végeztünk.

A 250 ng HU7ap fehérje 0,5 µg duplaszálú DNS, 5 µg Hu7ap 1,3 µg egyszálú RNS és 1 µg a Hu7ap peptid 200 ng egyszálú DNS futását gátolta a gélben. Wu7ap-nál is hasonló eredményeket kaptunk, de a Wu7ap affinitása nukleinsavhoz alacsonyabb volt: 1µg Wu7ap peptid 0,5 µg kétszálú DNS, 10 µg peptid 1,3 µg egyszálú RNS és 8 µg Wu7ap 200 ng egyszálú DNS gélbe lépését akadályozta meg (16. ábra).

A fenti adatokból kiszámoltuk a nukleinsavak és a peptidek moláris töltés arányát (Fried, 1989). Ezt az arányt úgy kaptuk meg, hogy a nukleinsav összes negatív töltését osztottuk 7ap peptidek összes pozitív töltésével a reakcióelegyben. A Hu7ap és duplaszálú DNS esetén ez az arány 3,65-nek, addig a Hu7ap és egyszálú RNS közt az arány alacsonyabbnak, 0,5-nek bizonyult. A legkisebb affinitást (0,34) a Hu7ap az egyszálú DNS-hez mutatta. A moláris töltésarányok a Wu7ap-nál következőképp alakultak: Wu7ap és kétszálú DNS között 0,5, Wu7ap és egyszálú RNS között 0,37 volt. Legalacsonyabb affinitással (0,07) a Wu7ap az egyszálú DNS-t kötötte. Az eredményekből azt következtetést vontuk le, hogy a genotípustól függetlenül a 7ap legnagyobb affinitással a duplaszálú DNS-t köti, legkisebb affinitással az egyszálú DNS-t.





**16. ábra:** Nukleinsav-7ap gél retardációs teszt. (A) RNS és 7ap kölcsönhatása. 1. sáv: 1,3  $\mu\text{g}$  RNS; 2-5.: 1,3  $\mu\text{g}$  RNS+Hu7ap felező hígításban (10  $\mu\text{g}$ , 5  $\mu\text{g}$ , 2,5  $\mu\text{g}$ , 1 $\mu\text{g}$ ); 6-9, 1,3  $\mu\text{g}$  RNS+Wu7ap felező hígításban (10  $\mu\text{g}$ , 5  $\mu\text{g}$ , 2,5  $\mu\text{g}$ , 1 $\mu\text{g}$ ).

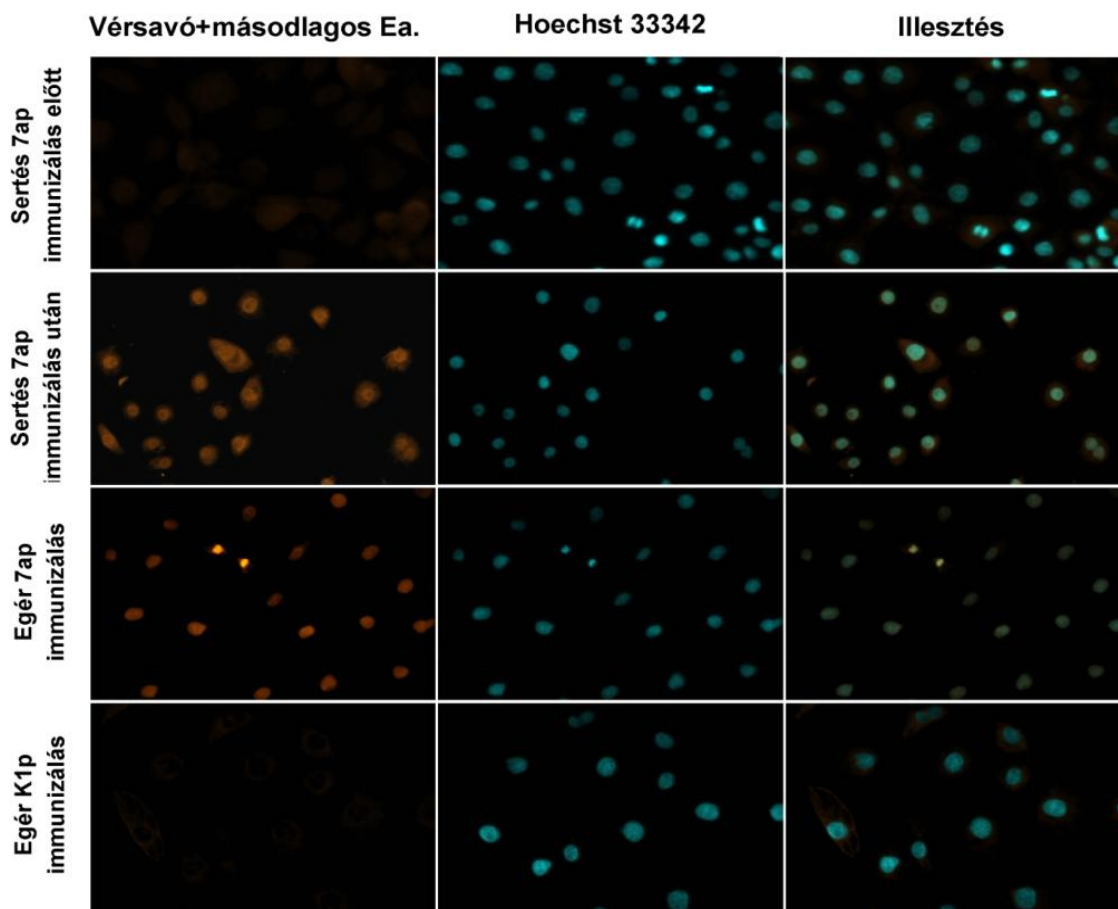
(B) Kétszálú DNS és 7ap kölcsönhatása. 1. sáv: 0,5  $\mu\text{g}$  DNS; 2-5. sáv: 0,5  $\mu\text{g}$  DNA+Hu7ap felező hígításban (0,5  $\mu\text{g}$ , 0,25  $\mu\text{g}$ , 0,125  $\mu\text{g}$ , 0,0625  $\mu\text{g}$ ); 6-9. sáv: 0,5  $\mu\text{g}$  DNS+Wu7ap felező hígításban (2  $\mu\text{g}$ , 1  $\mu\text{g}$ , 0,5  $\mu\text{g}$ , 0,25  $\mu\text{g}$ ).

(C) Egyszálú DNS és 7ap kölcsönhatása. 1. sáv: 0,2  $\mu\text{g}$  DNA; 2-5. sáv: 0,2  $\mu\text{g}$  DNS+Hu7ap felező hígításban (8  $\mu\text{g}$ , 2  $\mu\text{g}$ , 1  $\mu\text{g}$ , 0,5  $\mu\text{g}$ ); 6-9. sáv: 0,2  $\mu\text{g}$  DNA+Wu7ap felező hígításban (8  $\mu\text{g}$ , 2  $\mu\text{g}$ , 1  $\mu\text{g}$ , 0,5  $\mu\text{g}$ ).

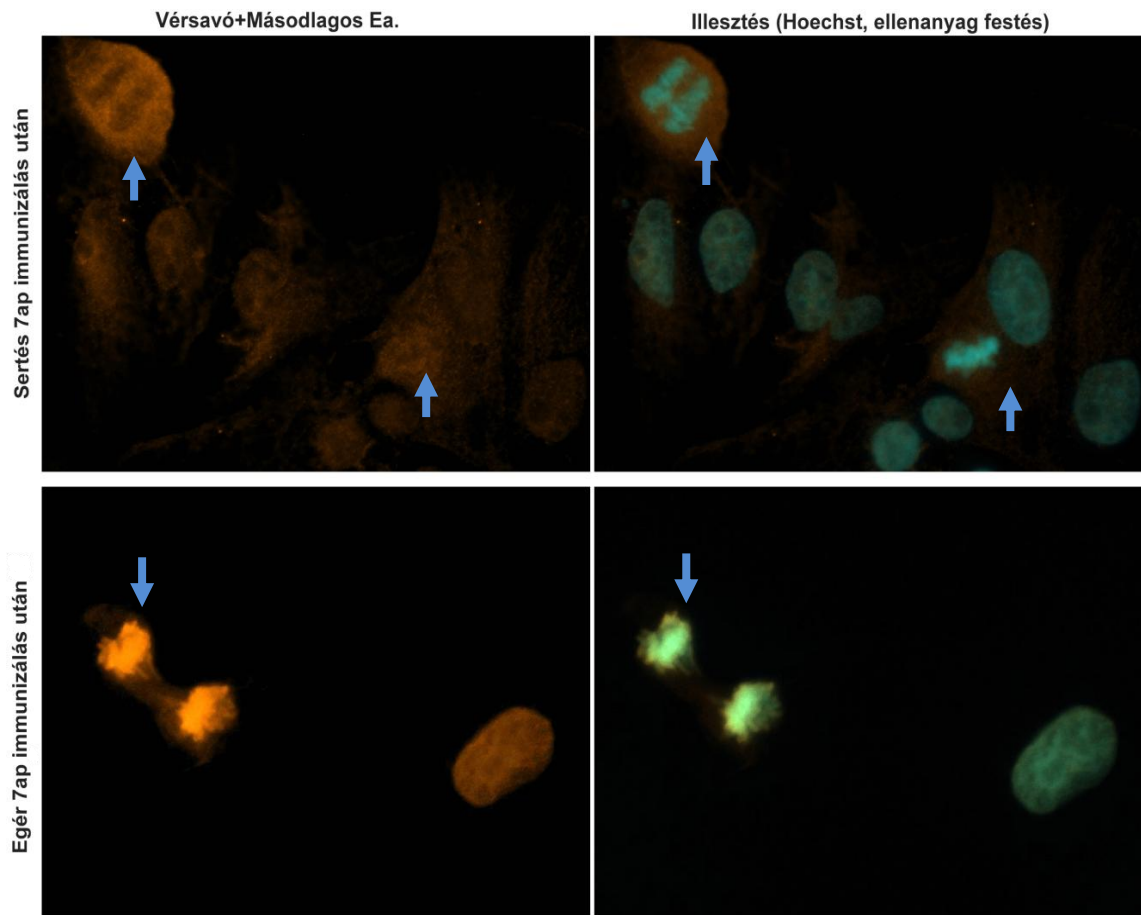
### 6.2.5 Sejtmag elleni antitestek indukciója

A Hu7ap jelenlétét a PRRSV-vel fertőzött Marc 145 sejtekben 7ap-vel immunizált állatok szérumával terveztük bizonyítani. Két egeret és két PRRSV negatív sertést oltottunk be peptidet tartalmazó oltóanyaggal, majd az immunizált állatok vérsavóját szerológiai vizsgálatokkal teszteltük. ELISA teszttel nem sikerült kimutatnunk különbséget az immunizált és nem immunizált állatok szérumai közt. Marc 145 sejteket transzfektáltuk Hu7ap-eGFP fúziós fehérje konstrukciókkal, azonban az immunfluoreszcenciás vizsgálat során egyik állat széruma se reagált a Hu7ap-eGFP-vel. Az eredményeink alapján az immunizált állatok széruma a sejtmagokkal (anti-nukleáris antitestek (ANA)) reagált és ez a reakció a két állatfajban eltért egymástól (17. ábra). Az inkomplett Freud adjuvánssal immunizált sertésben alacsonyabb ANA titer alakult ki, mint tiomerzál tartalmú adjuvánssal immunizáltban (előbbi állat széruma 40-szeres

hígításig, az utóbbi állaté 200-szoros hígításig mutatta az ANA jelenlétét). A sertésszérum a nem osztódó sejtek magjában egy úgy nevezett finom foltos festődést okozott, és nem reagált az osztódó sejtek kromoszómaival. Ez a fajta festődés azt valószínűsíti, hogy a sertésekben Ro és La ribonukleoproteinek ellen termelődhetnek antitestek (Buchner et al., 2014). A K1p kontroll peptiddel immunizált egerekben nem keletkeztek anti-nukleáris antitestek, viszont a 7ap-vel immunizált mindkét egérben még 200-szoros szérumszűrés esetén is kimutatható maradt. Az immunizált egerek széruma az osztódó sejtek kromoszómáját festette, amely duplaszálú DNS-kötő ellenanyagok jelenlétére utalhat (18. ábra) (Buchner et al., 2014).



**17. ábra:** Sejtmag elleni antitestek a 7ap-vel immunizált sertések és egerek vérsavójában. Sertéseknél, ugyanabból az állatból immunizálás előtt és után szérumot vettünk. Egereknél, az egyik egeret a 7ap-vel, míg a másik egeret K1p-immunizáltuk.



**18. ábra:** 100-szoros nagyításban ábrázoltuk az anti-nukleáris antitesteket tartalmazó szérummal kezelt Marc 145 sejteket. Míg sertés szérum nem festette az osztódó sejtek magjait, addig az egér szérumban az ANA erősen kötötte az osztódó sejtmagban a kromoszómákat (nyilakkal mutatva).

## 7. Megbeszélés

### 7.1 PRRSV 9625/2012 törzs jellemzése

A PRRSV két genotípusa közt a nukleotid szekvenciában akár 30-45%-nyi különbség is lehet (Hanada et al., 2005). Egy tanulmány alapján a PRRSV az egyik leggyorsabban mutálódó RNS vírus, mutációs rátája akár az évi  $4,7-9,8 \times 10^{-2}$  /nukleotidot is elérheti (Hanada et al., 2005; Jenkins et al., 2002). Jóllehet ennél konzervatívabb becslések a mutációs rátát évi 1,8 és  $7 \times 10^{-3}$ /nukleotid közé helyezik (Forsberg, 2005; Chang et al., 2002), de még ez alapján is a PRRSV az egyik legváltozékonyabb RNS vírus. A gyakorlatban ez azt jelenti, hogy évente 0,5-1%-nyit is változhat egy adott nukleotid szekvencia a terepen (Prieto et al., 2009), vagyis 4%-nyi különbség a 9625/2012 és az Amervac MLV genomja közt 4-8 évnyi változásnak feleltethető meg. 2004 óta több, Amervac MLV-vel 98-99%-nyi nukleotid egyezést mutató törzset izoláltak Magyarországon található sertéstelepekről (Balka et al., 2008). A korábbi megfigyelésekhez képest a 9625/2012-ben nagyobb genetikai különbséget tapasztaltunk. A nagy szekvenciális eltérés legvalószínűbb magyarázata az lehet, hogy az izolátum egy olyan 2004 és 2008 közt Magyarországra került Amervac vagy egy Olot/1991-gyel rokon törzs leszármazottja, amely 2012-ig észrevétlen maradt. Persze azt sem lehet kizárni, hogy 2012-ben hurcolták be Magyarországra egy ismeretlen forrásból.

A származtatott aminosav szekvencia elemzés viszonylag nagy eltérést (9% és 7%) tárt fel az nsp1 és nsp2 régióban a 9625/2012 és a referenciatörzsek között. Ennek az lehet az oka, hogy ez a két fehérje fontos szerepet játszik a veleszületett immunválasz egyik fontos részének, az 1-es típusú interferon (IFN- $\alpha$  és  $\beta$ ) szintézisének és szignalizációs útvonalának a gátlásában (Chen et al., 2010), ráadásul az nsp2-ben nagyszámú (hat darab) B-sejt epitóp is lokalizálódik (Yan et al., 2007). Az nsp2-re jellemző, hogy egy genotípuson belül is jelentős szekvenciális eltérések és különböző hosszúságú deléciók fordulnak elő, amelyek befolyásolhatják az adott törzs patogenitását (Allende et al., 1999; Choi et al. 2014; Gauger et al., 2012; Ostrowski et al., 2002).

Mivel a GP2, GP3, GP4 és GP5 fehérje antigénrégiói a neutralizáló hatású ellenanyagok fő célpontjai közé tartoznak (Vanhee et al., 2011), így megvizsgáltuk, milyen eltéréseket hordoznak az aminosav szekvenciában a feltételezett kiindulási törzsekhez (Amervac MLV és Olot/1991) képest.

Míg a GP2 fehérjén a neutralizáló hatású epitópok két egyedi aminosav cserét tartalmaztak, addig a nem a neutralizálókon összesen négy változást figyeltünk meg (5/A ábra). A szekvencia többi részén öt különbség volt, ebből az ötből két aminosav változás

AR<sub>33-48</sub>-tól upstream irányba helyezkedett el, így elképzelhető, hogy ez a két aminosav is az epitóp része (Oleksiewicz et al., 2002). Mivel az aminosav változások többsége az antigén régiókban található, így azt gondoltuk, hogy a mutációk az immunszelekció miatt bekövetkező antigénsodródás vagy „antigén drift” következményei. Az epitópokban a rokon törzsekhez, az Amervac MLV-hez és Olot/1991-hez képest történt változások lehetővé tehetik, hogy a neutralizáló ellenanyagok hatékonysága csökkenjen. Az ilyen típusú változatosságra való hajlamot korábban is megfigyelték Magyarországról izolált PRRSV törzseknél (Balka et al., 2008).

A GP3 fehérje AR<sub>53-68</sub> és AR<sub>70-88</sub> epitópjáról régóta úgy gondolják, hogy fontos szerepet játszhat a vírus és a sejt közti kölcsönhatásban (Oleksiewicz et al., 2002; Cancel-Tirado et al., 2004). Ezt a feltételezést bizonyítja, hogy az AR<sub>53-68</sub> ellen termelődő antitestek neutralizáló hatásúak (Vanhee et al., 2011). Az AR<sub>53-68</sub>-ban, AR<sub>70-88</sub>-ban történt három aminosav csere, és a másik neutralizáló epitópon (AR<sub>245-256</sub>) felfedezett három mutáció létrejöttében az immunrendszer által gyakorolt szelekciós nyomásnak lehetett szerepe. A GP3 fehérjén található 14 mutációból 6 darab az ismert antigén régiókra esik.

A GP4 egyetlen epitópjában (Vanhee et al., 2011; Meulenberg et al., 1997), az AR<sub>57-68</sub>-ben három aminosav változást találtunk. Ez megerősíti azt, hogy az epitóp ellenanyag-közvetítette szelekciós nyomás alatt áll (Costers et al., 2010). További vizsgálatok szükségesek annak bizonyítására, hogy az AR<sub>57-68</sub>-ben történt mutációk megakadályozzák a keresztreakció kialakulását a vakcinázásott vagy egy Olot/1991-szerű PRRSV fertőzésen átesett sertésekben.

Az 1-es genotípusú PRRS vírusokban a GP5-ön található AR<sub>29-35</sub> epitóppal szemben termelődő antitestek neutralizáló hatásúak (Wissink et al., 2003), azonban ellentétben a 2-es genotípussal, a downstream irányban levő AR<sub>37-45</sub> ellen termelődő ellenanyag nem rendelkezik neutralizáló képességgel (Ostrowski et al., 2002; Vanhee et al., 2011; Breedam et al., 2011). A két epitóp határa között, 36-38-as aminosav pozíciókban szubsztitúciók lokalizálódnak, így az antigén régió közelsége miatt feltételezzük, hogy erre a három aminosavra is szelekciós nyomást gyakorolhat az immunrendszer.

A sertésállományban a 9625/2012-es törzs komoly klinikai tünetekkel járó fertőzést okozott. A fertőzött telepről származó szérummintákból és az elpusztult állatokból a PRRSV mellett szerológiai vizsgálatokkal *Mycoplasma hyopneumoniae* jelenlétét is kimutatták. Ám más baktériumra, klasszikus és afrikai sertéspestisre, sertés influenzavírusra, Aujeszky-betegség vírusára a minták negatívnak bizonyultak. A két korokozó, PRRSV és *Mycoplasma hyopneumoniae* együttes jelenléte sokkal komolyabb tüneteket okoz, súlyosbítja a kialakuló tüdőgyulladást (Thacker et al., 1999).

## 7.2 PRRSV-2/Hungary/102/2012 törzs jellemzése

A 2-es típusú PRRSV törzsek főleg Észak-Amerikában fordulnak elő (Kvisgaard et al., 2013). Európából izolált törzsek három csoportba sorolhatóak: az első csoportba tartoznak azok a szekvenciák, amelyek ORF5-je 95%-nál nagyobb egyezést mutat az Ingelvac PRRS MLV-vel, második csoportba azokat az izolátumokat sorolják, amelyeknél nem egyértelmű, hogy közvetlen leszármazási kapcsolatban lennének a vakcinatörzsszel, mivel az ORF5 egyezés mértéke 91-95% között van. A harmadik csoportba tartozóknál az ORF5 szekvencia legalább 12%-ban eltér a vakcinatörzstől. A PRRSV-2/Hungary/102/2012 (102HU) a harmadik csoportba tartozik: ez az első Európából származó teljes nukleotid szekvencia, amely nem mutat rokoni kapcsolatot az Ingelvac vakcinatörzsszel. A GenBankban elérhető teljes szekvenciákhoz hasonlítva 13%-nyi különbséget figyeltünk meg, amely megerősíti a vizsgált törzs egyedi jellegét.

A 102HU teljes ORF5 szekvenciájával végzett filogenetikai vizsgálatok eredményei alapján a 2-es genotípus 2-es vonalába sorolható, de nagy hasonlóságot mutat több 1-es vonalú szekvenciával is. A legnagyobb egyezést a teljes ORF5 szekvenciákból felállított törzsfán 2000-es években izolált amerikai és kanadai törzsekkel mutatta. Az 1-es és a 2-es vonal Kanadából származik, 1990 évek elején izoláltak őket először és innen terjedt az Egyesült Államok északi és középső részeire (Brar et al., 2011; Shi et al., 2010a; Shi et al., 2010b). Ebből azt feltételezzük, hogy 102HU őse Kelet-Európába 10-15 évvel ezelőtt kerülhetett be, ám megbízható szállítmányozási adatok hiányában nem lehet azonosítani a fertőzés forrását. A behurcolás után elszigetelten fejlődhetett, és csak 2005-ben mutatták ki Komárom megyében két sertéslepről (HU12 és HU21 ORF5 szekvenciák (4. táblázat)). Az egyik lepről 2012-ben izoláltuk a vírust (102HU-t) és szekvenáltuk a teljes genomját. A három izolátum között az ORF5 egyik legváltozékonyabb régiójában mindössze 3%-nyi eltérést találtunk nukleotidszinten, és 1%-nyi eltérést aminosavszinten. A gyorsan változó fehérjedoménban történő viszonylag lassú változás arra utalhatott, hogy az 1-es genotípusú MLV-vel történő vakcinázás valószínűleg nem gyakorolt jelentős szelektív nyomást a 2-es genotípusú törzsekre, így közel hét évig változatlan maradt a sertésállományban.

A magyar határhoz közel, Szlovákiában található komáromi járásból egy 102HU-vel nagy egyezést mutató törzset izoláltak (Jacková et al., 2013). A részleges ORF5 szekvencia (36M törzs, 4. táblázat) nukleotidszinten 95%-nyi, aminosavszinten 97%-nyi hasonlóságot mutatott 102HU-vel. A határ közelsége elképzelhetővé teszi, hogy Szlovákiából került hozzánk a vírus, de a fordítottja is lehetséges. A nagyfokú hasonlóság a szlovák és a magyar izolátumok között, és minden más európai

szekvenciától való határozott eltérés megerősíti azt a feltételezést, hogy egy közös forrásból származnak.

A JAX1 és VR-2332 referenciatörzsekhez illesztettük a 102HU nukleotid és a származtatott aminosav szekvenciáit. A nsp2 fehérje nukleotid szekvenciájában több egyedi deléciót és inzerciót találtunk. Ellenőrzött körülmények között végzett kísérletek szükségesek annak megállapításához, hogy az nsp2-ben történt változások okoznak-e különbséget a referenciatörzsekhez képest a patogenitásban, a szövettropizmusban vagy a növekedési sebességben.

A GP2 fehérje antigénrégiói viszonylag konzervatívak. Azt gondoljuk, hogy a fehérje olyan funkcionális részeiben található, amelyek az aminosav-sorrendben történő változásokat nem, vagy csak kis mértékben tolerálják. A mutációk többségét az N-terminálison (GP2<sub>1-40</sub>) és a C-terminálison (GP2<sub>240-256</sub>) figyeltük meg. Az N-terminális szignálpeptidként funkcionál, és tartalmaz egy hidrofób részt (GP2<sub>27-40</sub>), amely a szignálpeptidet a membránba horgonyozza (Dokland, 2010). Az összes PRRSV glikoprotein N-terminális régiójának (GP3<sub>1-30</sub>, GP4<sub>1-20</sub> és GP5<sub>1-31</sub>) szekvenciája változékony, ám mivel szignálpeptidként funkcionálnak, a fizikai-kémiai tulajdonságaik erősen konzerváltak (Das et al., 2011; Thaa et al., 2013; Meulenber, 2000; Kim et al., 2013).

A GP3 epitópok – az AR<sub>137-159</sub> kivételével – kevés mutációt tartalmaznak: ennek magyarázata hasonló lehet, mint a GP2-nél. A GP4-en az AR<sub>51-65</sub> egy különösen változékony epitóp. Az 1-es genotípusú PRRSV fertőzésben az ellene termelődő ellenanyagok bizonyítottan neutralizáló hatásúak. Costers és munkatársai (2010) megfigyelték, hogy *in vitro* körülmények közt az epitóp érzékeny monoklonális ellenanyag által indukált immunszelekcióra. Azt gondoljuk, ez magyarázatot adhat az általunk is megfigyelt variabilitásra. A GP3 konzervált C-terminális transzmembrán régiója (GP3<sub>181-197</sub>) átfed a GP4 variábilis N-terminális részével. A transzmembrán (TM) régiót és a T-sejt epitópot (Tce7–15) is tartalmazó szignálpeptidet ugyanaz a nukleotid szekvencia kódolja. Hasonlóan átfedő szekvencia figyelhető meg a GP2 konzervált C-terminális része és a GP3 szignálpeptidjét is tartalmazó variábilis N-terminális között. A fehérje TM régiója konzervatív, ám a vele átfedő fehérje szignálpeptidje hipervariábilis, mutációkban gazdag. A szekvencia változatosság ellenére a szignálpeptid funkció fennmarad. Erre az a magyarázat, hogy az aminosav összetétel tág határok között változhat. A funkcióhoz az szükséges, hogy a peptid elején pozitívan töltött aminosavak, utána egy hidrofób rész, a végén pedig egy poláris régió legyen, amely tartalmazza a szignálpeptidáz hasítóhelyét. Ezeknek a feltételeknek rengeteg aminosavsorrend megfelel. A transzmembrán régió szekvenciája is tág határok között változhatna, TM hélix funkció (hélix hidrofób aminosavakkal) nem indokolja konzerváltságát, mivel ennek

létrejöttéhez az szükséges, hogy a hélix elején és végén triptofán vagy pozitívan töltött aminosavak legyenek, és a hélixben a hidrofobicitás optimális legyen. Feltételezésünk alapján a TM hélix konzervációja egy eddig ismeretlen, járulékos funkció (például fehérje-fehérje interakció) következménye lehet. A 102HU GP4 fehérjéje az AR<sub>51-65</sub>-ben egyvel több glikozilációs helyet (N57) tartalmaz a referenciatörzsekhez képest (Das et al., 2011). Egy neutralizáló epitóp glikozilációja csökkenti a fehérje immunogenitását, és megakadályozhatja a gyors és hatékony immunválasz létrejöttét: ezt a jelenséget hívják „glycan shieldnek”.

A GP5 fehérje lehasadó szignálpeptidjének része az AR<sub>1-15</sub>. Az AR<sub>27-35</sub> valószínűleg „csali epitópként” funkcionálhat, szekvenciája gyorsan változik, és az ellene termelődő ellenanyagoknak nincs neutralizáló hatása. Csali epitópoknak nevezzük a vírusfehérjék azon részeit, amely ellen korán kialakul erős immunválasz, ám a vírusfertőzés ellen nem ad védelmet, csak eltereli az immunválaszt fontosabb, neutralizáló epitópokról. Friss kutatási eredmények azt mutatják, hogy ez az epitóp csak a GP5 fehérjék nagyon kis hányadában fordul elő, többségben a szignálpeptiddel együtt lehasad (Ostrowski et al., 2002; Thaa et al., 2013). Egy másik tanulmány kimutatta, hogy ugyanezen az epitópon a 32, 33 és 34 pozícióban levő aminosavak erős pozitív szelekció alatt állnak (Delisle et al., 2012). Pozitív szelekciós nyomás általában azokra az aminosavakra hat, amelyek hozzájárulnak a vírus reprodukciós sikeréhez. A 102HU három lehetséges glikozilációs hellyel (N30, az N34 és az N35) rendelkezik AR<sub>27-35</sub>-ben. Az N34-es helyről bizonyították NVSL 97-7895 törzsben, hogy glikozilálódik (Delisle et al., 2012). Az egymáshoz való közelség miatt kialakuló térbeli gátlás elég valószínűtlenné teszi a PRRSV-2/Hungary/102/2012-ban, hogy mindhárom helyhez a GP5 fehérjén egy glikán kapcsolódna. A N30, az N34 és az N35 kívül még két konzervált N-glikozilációs hely (N44 és N51) található a GP5-ön, és ez az öt hely egy nagyon ritka glikozilációs mintázatot alkot, amely 2-es genotípusú PRRSV-k csak 1%-ában található meg (Delisle et al., 2012). Egy korábbi tanulmány megmutatta, hogy a VR-2332 törzs GP5 fehérjéjén a glikoziláció különböző kombinációkban történik, így különböző glikoformák jönnek létre (Thaa et al., 2013). Azt gondoljuk, hogy a PRRSV-2/Hungary/102/2012 esetén is hasonlóan történhet glikoziláció. Mivel az ORF5a átfed ezzel a régióval, így nem lehet teljesen kizárni annak lehetőségét, hogy a mintázat az ORF5a-n belüli változások eredménye (Robinson et al., 2013).

Mivel a GP4-ben és a GP5-ben az aminosav változások többsége az antigén régiókban találhatóak, így azt gondoljuk, hogy a törzs evolúciójában fontos szerepet játszhatott az immunrendszer által gyakorolt szelekciós nyomás. A 2000-es évek elején egy gyors növekedési fázist figyeltek meg a 2-es genotípusú törzsek diverzitásában (Shi et al., 2010b). A 2005-ben és 2012-ben izolált magyarországi 2-es



típusú minták között a gyorsan változó ORF5 ektodomén szekvenciájában aminosavszinten alig 1%-nyi különbséget találtunk. A megfigyelések arra utalhatnak, hogy a vizsgált törzs evolúciója két fázisban történt. A korai időszakban gyorsan változott, mivel főleg 2-es genotípusú törzsek vették körül. Amikor Európába került, lelassulhatott az evolúciós változás, mert az európai sertéstelepeken a vakcinázás a leggyakrabban előforduló, 1-es genotípusú PRRSV törzsek ellen irányult.

### 7.3 ORF7a-ról átíródó fehérje jellemzése

A PRRSV genomban a magas mutációs ráta ellenére több olyan nukleotid szekvencia található, amely egynél több fehérjét kódol. Az ORF2b teljesen átfed az ORF2a-val és az ORF5 és ORF5a esetén is hasonló átfedés tapasztalható (Wu et al., 2001; Firth et al., 2011). 46 darab egymástól szekvenciában különböző PRRSV genomját illesztettük össze, és a nukleokapszid génen (ORF7) belül egy konzervált ORF-et (ORF7a) fedeztünk fel. Az ORF7 régióra tervezett eGFP és Flag fúziós konstrukciókkal megerősítettük a transzlációt az ORF7-tel átfedő ORF7a-ról. A különböző PRRSV törzsekben az ORF7a metioninja konzervált pozícióban helyezkedik el, így azt gondoljuk, hogy az összes PRRSV törzsben megtörténhet a 7ap átírása.

Nukleokapszid génnel átfedő alternatív ORF-ek jelenlétét több víruscsaládban bizonyították. A *Flaviviridae* családba tartozó Hepatitis C vírusnál az Alternate Reading Frame Protein (ARFP) a Core fehérjével fed át. Az ARFP a plasmacytoid dendritikus sejtekben apoptózist indukál (Samrat et al., 2014), emellett gátolja az INF- $\alpha$  és IL-10 termelődését, így immunosuppresszív hatással is rendelkezik (Xu et al., 2014). Nemcsak a Hepatitis C-ben, hanem a *Nidovirales* rendbe, a *Betacoronavirus* nemzetségbe sorolt SARS vírus (Meier et al., 2006), szarvasmarha koronavírus (Senanayake és Brian, 1997) és egér hepatitis vírus (MHV) (Fischer et al., 1997) nukleokapszid génjében is találtak olyan alternatív ORF-et, amelyről fehérje íródik át. A MHV vírus úgynevezett 1-es proteinje egy szerkezeti fehérje, melynek hiánya csökkenti a vírus növekedését a sejtenyészetben (Fischer et al., 1997), a SARS vírus ORF-9B peptidje a mitokondriumban lokalizálódik, köti a PCBP2-t és AIP4-et, így képes autofágiát indukálni, és csökkenteni a sejt interferon válaszát (Shi et al., 2014). Habár az alternatív ORF-ekről leíró fehérjék funkciója még a rokon vírusokban is meglehetősen eltérő lehet, de mindre jellemző, hogy elősegíti a vírus terjedését, akár közvetlenül, mint egy virális fehérje, vagy közvetetten, mint immunosuppresszív hatású járulékos fehérje.

A PRRSV 7ap biokémiai jellegzetességei immunosuppresszív tulajdonságra utalnak. A 7ap képes kötődni az emlős IgG Fc részéhez és gátolni a komplement aktivációt. A komplement aktiváció klasszikus útvonalának első komponense a C1q

komplex. A globuláris feje az antitest CH2 doménjéhez kötődik. A C1q számos olyan bázikus tulajdonságú aminosavat tartalmaz (7 arginin, 1-1 lizin és hisztidin), amelyek feladata az IgG Fc részével való kölcsönhatás (Schneider és Zacharias, 2012.). A feltételezések szerint IgG felismerésében az Arg<sup>B114</sup> és az Arg<sup>B129</sup> aminosav játszik fontos szerepet (Marqués et al., 1993). Azt gondoljuk, hogy a nagyszámú arginin a 7ap-ben lehetővé teszi CH2 doménhez való kapcsolódást, így gátolva az Fc rész és C1q közti kölcsönhatást.

Több vírustörzsben (Poxviridae, Retroviridae, Herpesviridae) fedeztek fel már olyan virális fehérjéket, amelyek a komplement fehérjékkel kölcsönhatva gátolták a vírusneutralizációt (Hulo et al., 2011a). Több vírusfajban (HCV, HHV-5, MCMV) találtak Fc receptor-szerű fehérjéket, amelyek IgG Fc részéhez kötődve megakadályozta az Fc receptortól függő aktivációt (Hulo et al., 2011b). Tudomásunk szerint a PRRSV 7ap az első olyan leírt vírusfehérje, amely a komplement aktivációt az IgG Fc részhez való közvetlen kötődéssel gátolja. Jelenleg nem világos, hogy fertőzés során a 7ap mikor és hogyan lép kölcsönhatásba az IgG-vel. Fluorometriás mérésekkel nem sikerült bizonyítani 7ap-eGFP fehérje *in vitro* szekrécióját. Elképzelhetőnek tartjuk, hogy *in vivo* körülmények között a 7ap a fertőzött makrofágokból szekretálódik vagy a lizálódott sejtekből kerül a sejt közötti térbe.

A 7ap nemcsak ellenanyagot köt, hanem a nukleinsavakkal is képes kölcsönhatásba lépni. A többszörös pozitív töltés hordozása nem magyarázza a nukleinsav kötő tulajdonságát, mivel több olyan bázikus fehérje létezik, amely pozitív töltései ellenére sem kötődik nukleinsavhoz (Bousarghin et al., 2003). Azt gondoljuk, hogy a 7ap fehérje nukleinsav kötő képessége a funkciójának következménye, és nem a pozitív töltéséből eredő járulékos tulajdonság. Elméletünket az is támogatja, hogy két egymástól eltérő aminosav szekvenciájú 7ap peptid is rendelkezett erős duplaszálú DNS- és RNS-kötő tulajdonsággal. Feltételezésünket tovább erősíti az a tanulmány, amelyben egy emberi papillomavírusban (HPV-ben) található pozitívan töltött, de a 7ap-nél gyengébb DNS-kötő tulajdonsággal rendelkező fehérje képes volt a DNS-t megvédeni a DNáz hatásától, így lehetővé tette a transzfekciót COS-7 sejtekbe (Bousarghin et al., 2003).

A 7ap lokalizációból több lehetséges funkciót lehet feltételezni. Az egyik lehetőség, hogy a sejtmagban együttműködve a nukleokapszid fehérjével zavarja az mRNS normális transzkripcióját és processzációját (You et al., 2008). Ám azt is elképzelhetőnek tartjuk, hogy a sejtmagból a sejtplazmába kerülve kölcsönhatásba lép mRNS-ekkel és befolyásolja a fehérjék transzlációját. A nukleinsavakon kívül a sejtben található fehérjékkel való interakciót sem lehet kizárni. A legtöbb fehérje sejtben belül negatív töltéssel rendelkezik (Schwartz et al., 2001), ám a velük kölcsönhatásba kerülő

szabályzó fehérjék sokszor rövidek és bázikus tulajdonságúak (Kiraga et al., 2007). A HIV-1-ben a Tat egy transzkripciót befolyásoló nukleinsav kötő fehérje, amely a 7ap-hez hasonlóan rövid és bázikus. Újabb kutatások megállapították, hogy nemcsak nukleinsav kötő tulajdonsággal rendelkezik, hanem egy argininben különösen gazdag résznek köszönhetően a citoplazmában található I $\kappa$ B- $\alpha$  fehérjéhez is képes kötődni (Vitagliano et al., 2011).

Az immunizáció során különféle adjuvánsokat használtunk és különböző állatfajokat, sertéseket és egereket oltottunk. A Hu7ap-vel immunizált állatok szérumban nem mutattunk ki 7ap-vel szemben specifikusan termelődő ellenanyagot. Az eredmény nem volt teljesen váratlan, az immunizáció kisméretű virális fehérjék ellen gyakran jár sikertelenül (Betakova et al., 2000; Zádori et al., 2005; Celis, 2002). A szérumok tesztelése során az összes immunizált állat vérsavójából sejtmag elleni autoantitesteket mutattunk ki, autoantitestek jelenlétét PRRSV fertőzés után már korábban is leírtak (Lemke et al., 2004). Feltételezésünk szerint a 7ap idézheti elő, vagy legalábbis részben felelős lehet az autoantigének elleni immuntolerancia meggyengüléséért. A limfociták érése során mindig képződnek olyan sejtek (autoreaktív limfociták), amelyek saját fehérjét, nukleinsavat (autoantigéneket) ismernek fel. Az egészséges szervezetben több olyan mechanizmus található, amely megakadályozza az autoantigének elleni immunreakció kialakulását. Több, pozitívan töltött virális és bakteriális fehérjéről bebizonyították (Hausmann et al., 1999; Quaratino et al., 1995; Wucherpfennig és Strominger, 1995), hogy aminosav szekvenciában tőle eltérő, pozitívan töltött emberi autoantigénekre (mylein bázikus fehérje, ribonukleoprotein komplexek Ro és La, valamint C1q komplement fehérje) hasonlít (Stoyanova et al., 2012; Routsias és Tzioufas, 2010; Mameli et al., 2014), így autoreaktív T- és B-sejteket képes aktiválni (Wucherpfennig és Strominger, 1995; Sospedra et al., 2005; Vaughan et al., 1995). Néha előfordul, hogy az autoantigén és autoantitestek termelését kiváltó fehérje közti keresztreakciót nem lehet észlelni (Vaughan et al., 1995), valószínűleg ez történt a Hu7ap esetében is. Egyik lehetséges magyarázat erre, hogy a Hu7ap önmagában nem immunogén, de hozzákötődik a fertőzés során elpusztult sejtekből, vagy az immunizáció esetén a mechanikai sérülés, és az adjuváns okozta nekrozis, apoptózis során kiszabadult DNS-hez és nukleoproteinekhez. Normál esetben az elpusztult sejtek maradványait a szervezet belső tisztító mechanizmusa gyorsan eltünteti, így a DNS vagy a nukleoprotein specifikus B-sejtek nem tudnak aktiválódni. Ám ha tisztító mechanizmust közvetítő szérum amyloid P és C reaktív protein valami miatt nem tudja ellátni feladatát, például a Hu7ap hozzájuk kötődött, akkor lehetséges lesz az autoreaktív B-sejtek aktiválódása (Mold et al., 2001; Bickerstaff et al., 1999; Du Clos, 1996).

A PRRSV-ben az evolúció során több olyan mechanizmus alakult ki, amely képes befolyásolni a szervezet vírus elleni válaszát, és lassítani hatékony immunválasz kialakulását. A 7ap lokalizációja és különleges immunológiai tulajdonságai azt mutatják, hogy a fehérjének fontos szerepe lehet a gyors és hatékony immunválasz elkerülésében. További *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok szükségesek, hogy jobban megértsük a vírus életsiklusában betöltött szerepét.

## 8. Új tudományos eredmények

1. Meghatároztuk és elemeztük a 9625/2012 izolátum teljes genomszekvenciáját, valamint a filogenetikai helyét.
2. PRRSV-2/Hungary/102/2012 szekvenciája az első olyan 2-es genotípusú teljes genom Európában, amely nem Ingelvac MLV eredetű.
3. PRRSV-ben a GP2 és a GP3 fehérje transzmembrán doménjait ugyanazok a nukleotid szekvenciák kódolják, mint a GP3 és GP4 szignálpeptidjeit. A transzmembrán régió konzervált, ám a vele átfedő szignálpeptid minden esetben hipervariábilis.
4. Bioinformatikai módszerekkel bizonyítottuk egy új ORF jelenlétét (ORF7a) a vírus genomjában, és fúziós konstrukciókkal igazoltuk, hogy az ORF7a-ról fehérjetermék íródik le.
5. Az ORF7a egy rövid, erősen pozitív töltésű peptidet kódol (7ap). A PRRSV 1-es és 2-es genotípusából származó 7ap IgG, DNS- és RNS-kötő képességgel rendelkezik, a 7ap kötőhelye az IgG-n az Fc rész CH2 doménjában található.
6. Az 1-es genotípusból származó 7ap fehérje az egérben és a sertésben képes sejtmag ellenes autoantitestek termelését indukálni.

## 9. Irodalomjegyzék

- Allan, G.M., McNeilly, F., Ellis, J., Krakowka, S., Meehan, B., McNair, I., Walker, I., Kennedy, S.: **Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication**, Arch. Virol., 145. 2421-2429, 2000.
- Allende, R., Lewis, T.L., Lu, Z., Rock, D.L., Kutish, G.F., Ali, A., Doster, A.R., Osorio, F.A.: **North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions**, J. Gen. Virol., 80. 307–315, 1999.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J.: **Basic local alignment search tool**, J. Mol. Biol., 215. 403–410, 1990.
- Ansari, I.H., Kwon, B., Osorio, F.A., Pattnaik, A.K.: **Influence of N-Linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies**, J. Virol., 80. 3994–4004, 2006.
- Balka, Gy., Hornyák, Á., Bálint, Á., Kiss, I., Kecskeméti, S., Bakonyi, T., Rusvai, M.: **Genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains circulating in Hungarian swine herds**, Vet. Microbiol., 127. 128–135, 2008.
- Balka, Gy.: **A PRRS diagnosztikájának javítása, a magyarországi járványtani helyzet felmérése és az itthon előforduló törzsek genetikai tulajdonságainak vizsgálata**, SZIE DI. PhD értekezés, 2009.
- Bergeron, J., Menezes, J., Tijssen, P.: **Genomic organization and mapping of transcription and translation products of the NADL-2 strain of porcine parvovirus**, Virology, 197. 86–98, 1993.
- Betakova, T., Wolffe, E.J., Moss, B.: **The vaccinia virus A14.5L gene encodes a hydrophobic 53-amino-acid virion membrane protein that enhances virulence in mice and is conserved among vertebrate poxviruses**, J. Virol., 74. 4085-4092, 2000.

- Bickerstaff, M.C., Botto, M., Hutchinson, W.L., Herbert, J., Tennent, G.A., Bybee, A., Mitchell, D.A., Cook, H.T., Butler, P.J., Walport, M.J., Pepys, M.B.: **Serum amyloid P component controls chromatin degradation and prevents antinuclear autoimmunity**, *Nat. Med.*, 5. 694-697, 1999.
- Bousarghin, L., Touzé, A., Combita-Rojas, A.L., Coursaget, P.: **Positively charged sequences of human papillomavirus type 16 capsid proteins are sufficient to mediate gene transfer into target cells via the heparan sulfate receptor**, *J. Gen. Virol.*, 84. 157-164, 2003.
- Brar, M.S., F, M., Carman, S., Ge, L., Murtaugh, M.P., Leung, F.C.: **Porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Ontario, Canada 1999–2010: diversity and restriction fragment length polymorphism**, *J. Gen. Virol.*, 9. 1391–1397, 2011.
- Breedam, V.W., Delputte P.L., Van Gorp, H., Misinzo, G., Vanderheijden, N., Duan, X., Nauwynck, H.J.: **Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage**, *J. Gen. Virol.*, 91. 1659-1667, 2010.
- Breedam, V.W., Costers, S., Vanhee, M., Gagnon, C.A., Rodríguez-Gómez, I.M., Geldhof, M., Verbeeck, M., Van Doorselaere, J., Karniychuk, U., Nauwynck, H.J.: **Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-specific mAbs: supporting diagnostics and providing new insights into the antigenic properties of the virus**, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 141. 246–257, 2011.
- Buchner, C., Bryant, C., Eslami, A., Lakos, G.: **Anti-nuclear antibody screening using HEp-2 cells**, *J. Vis. Exp.*, 88. e51211, 2014.
- Cancel-Tirado, S.M., Evans, R.B., Yoon, K.J.: **Monoclonal antibody analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus epitopes associated with antibody-dependent enhancement and neutralization of virus infection**, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 102. 249–262, 2004.
- Celis, E.: **Getting peptide vaccines to work: just a matter of quality control?** *J. Clin. Invest.*, 110. 1765-1768, 2002.
- Chand, R.J., Tribble, B.R., Rowland, R.R.R.: **Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus**, *Curr. Opin. Virol.*, 2. 256-263, 2012.

- Chang, C.C., Yoon, K.J., Zimmerman, J.J., Harmon, K.M., Dixon, P.M., Dvorak, C.M., Murtaugh, M.P.: **Evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during sequential passages in pigs**, *J. Virol.*, 76. 4750-4763, 2002.
- Charerntantanakul, W.: **Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines: Immunogenicity, efficacy and safety aspects**, *World J. Virol.*, 1. 23-30, 2012.
- Chen, Z., Lawson, S., Sun, Z., Zhou, X., Guan, X., Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., Fang, Y.: **Identification of two auto-cleavage products of nonstructural protein 1 (nsp1) in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infected cells: nsp1 function as interferon antagonist**, *Virology*, 398. 87–97, 2010.
- Chirico, N., Vianelli, A., Belshaw, R.: **Why genes overlap in viruses**, *Proc. Biol. Sci.*, 27. 3809-3817, 2010.
- Choi, Y.K., Goyal S.M., Joo, H.S.: **Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs**, *Can. Vet. J.*, 44. 735–737, 2003.
- Choi, H.W., Nam, E., Lee, Y.J., Noh, Y.H., Lee, S.C., Yoon, I.J., Kim, H.S., Kang, S.Y., Choi, Y.K., Lee, C.: **Genomic analysis and pathogenic characteristics of Type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus nsp2 deletion strains isolated in Korea**, *Vet. Microbiol.*, 170. 232-245, 2014.
- Christopher-Hennings, J., Holler, L.D., Benfield, D.A., Nelson, E.A.: **Detection and duration of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen, serum, peripheral blood mononuclear cells, and tissues from Yorkshire, Hampshire, and Landrace boars**, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 13. 133–142, 2001.
- Collins, J.E., Benfield, D.A., Christianson, W.T., Harris, L., Hennings, J.C., Shaw, D.P., Goyal, S.M., McCullough, S., Morrison, R.B., Joo, H.S., et al.: **Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs**, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 4. 117-126, 1992.
- Costers, S., Vanhee, M., Breedam, V.W., Van Doorselaere, J., Geldhof, M., Nauwynck, H.J.: **GP4-specific neutralizing antibodies might be a driving force in PRRSV evolution**, *Virus Res.*, 154. 104–113, 2010.



- Das, P.B., Vu, H.L., Dinh, P.X., Cooney, J.L., Kwon, B., Osorio, F.A., Pattnaik, A.K.: **Glycosylation of minor envelope glycoproteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in infectious virus recovery, receptor interaction, and immune response**, *Virology*, 410. 385–394, 2011.
- Delisle, B., Gagnon, C.A., Lambert, M.È., D’Allaire, S.: **Porcine reproductive and respiratory syndrome virus diversity of Eastern Canada swine herds in a large sequence dataset reveals two hypervariable regions under positive selection**, *Infect. Genet. Evol.*, 12. 1111–1119, 2012.
- Díaz, I., Pujols, J., Ganges, L., Gimeno, M., Darwich, L., Domingo, M., Mateu, E.: **In silico prediction and ex vivo evaluation of potential T-cell epitopes in glycoproteins 4 and 5 and nucleocapsid protein of genotype I (European) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus**, *Virus Res.*, 118. 98–104, 2009.
- Dokland, T.: **The structural biology of PRRSV**, *Virus Res.*, 154. 86–97, 2010.
- Du Clos, T.W.: **The interaction of C-reactive protein and serum amyloid P component with nuclear antigens**, *Mol. Biol. Rep.*, 23. 253-260, 1996.
- Edgar, R.C.: **MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput**, *Nucleic Acids Res.*, 32. 1792–1797, 2004.
- Etherington, G.J., Dicks, J., Roberts, I.N.: **Recombination Analysis Tool (RAT): a program for the high-throughput detection of recombination**, *Bioinformatics*, 21. 278–281, 2005.
- Faaberg, K.S., Hocker, J.D., Erdman, M.M., Harris, D.L., Nelson, E.A., Torremorell, M., Plagemann, P.G.: **Neutralizing antibody responses of pigs infected with natural GP5 N-glycan mutants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus**, *Viral. Immunol.*, 19. 294–304, 2006.
- Fang, Y., Snijder, E.J.: **The PRRSV replicase: exploring the multifunctionality of an intriguing set of nonstructural proteins**, *Virus Res.*, 154. 61-76, 2010.
- Fang, Y., Treffers, E.E., Li, Y., Tas, A., Sun, Z., van der Meer, Y., de Ru, A.H., van Veelen, P.A., Atkins, J.F., Snijder, E.J., Firth, A.E.: **Efficient -2 frameshifting by mammalian ribosomes to synthesize an additional arterivirus protein**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109. E2920-2928, 2012.

- Firth, A.E., Brierley, I.: **Non-canonical translation in RNA viruses**, *J. Gen. Virol.*, 93. 1385-1409, 2012.
- Firth, A.E., Zevenhoven-Dobbe, J.C., Wills, N.M., Go, Y.Y., Balasuriya, U.B.R., Atkins, J.F., Snijder, E.J., Posthuma, A.C.C.: **Discovery of a small arterivirus gene that overlaps the GP5 coding sequence and is important for virus production**, *J. Gen. Virol.*, 92. 1097-1106, 2011.
- Fischer, F., Peng, D., Hingley, S.T., Weiss, S.R., Masters, P.S.: **The internal open reading frame within the nucleocapsid gene of mouse hepatitis virus encodes a structural protein that is not essential for viral replication**, *J. Virol.*, 71. 996-1003, 1997.
- Forsberg, R.: **Divergence time of porcine reproductive and respiratory syndrome virus subtypes**, *Mol. Biol. Evol.*, 22. 2131–2134, 2005.
- Frydas, I.S., Verbeeck, M., Cao, J., Nauwynck, H.J.: **Replication characteristics of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) European subtype 1 (Lelystad) and subtype 3 (Lena) strains in nasal mucosa and cells of the monocytic lineage: indications for the use of new receptors of PRRSV (Lena)**, *Vet. Res.*, 44. 73, 2013.
- Fried, M.G.: **Measurement of protein-DNA interaction parameters by electrophoresis mobility shift assay**, *Electrophoresis*, 10. 366-376, 1989.
- Gauger, P.C., Faaberg, K.S., Guo, B., Kappes, M.A., Opriessnig, T.: **Genetic and phenotypic characterization of a 2006 United States porcine reproductive and respiratory virus isolate associated with high morbidity and mortality in the field**, *Virus Res.*, 163. 98–107, 2012.
- Gómez-Laguna, J., Salguero, F.J., Pallarés, F.J., Carrasco, L.: **Immunopathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome in the respiratory tract of pigs**, *Vet. J.*, 195. 148-155, 2013.
- Han, K., Seo, H.W., Park, C., Kang, I., Youn, S.K., Lee, S.Y., Kim S.H., Chae, C.: **Comparative virulence of reproductive diseases caused by type 1 (European-like) and type 2 (North American-like) Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in experimentally infected pregnant gilts**, *J. Comp. Pathol.*, 150. 297–305, 2014.

- Han, K., Seo, H.W., Park, C., Kang, I., Youn, S.K., Lee, S.Y., Kim, S.H., Chae, C.: **Comparison of the virulence of European and North American genotypes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in experimentally infected pigs**, *Vet. J.*, 195. 313–318, 2013.
- Hanada, K., Suzuki, Y., Nakane, T., Hirose, O., Gojobori, T.: **The origin and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses**, *Mol. Biol. Evol.*, 22. 1024-1031, 2005.
- Hausmann, S., Martin, M., Gauthier, L., Wucherpfennig, K.W.: **Structural features of autoreactive TCR that determine the degree of degeneracy in peptide recognition**, *J. Immunol.*, 162. 338-344, 1999.
- Holtkamp, D.J., Kliebenstein, J.B., Neumann, E., Zimmerman, J.J.: **Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers**, *J. Swine Health Prod.*, 21. 72–84, 2013.
- Hornyák, Á., Pálfi, V., Karakas, M.: **Porcine reproductive and respiratory syndrome szerológiai felmérése Magyarországon**. Akadémiai beszámoló, 1996 10. előadás.
- Hulo, C., de Castro, E., Masson, P., Bougueleret, L., Bairoch, A., Xenarios, I., Le Mercier, P.: **ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity**, *Nucleic Acids Res.*, 39. D576-582, 2011a.  
[http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_protein/811.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/811.html) (April 4, 2015)
- Hulo, C., de Castro, E., Masson, P., Bougueleret, L., Bairoch, A., Xenarios, I., Le Mercier, P.: **ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity**, *Nucleic Acids Res.*, 39. D576-582, 2011b.  
[http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/812.html#tab6](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/812.html#tab6) (April 4, 2015)
- Jacková, A., Vlasáková, M., Mandelík, R., Vilček, S.: **Genetic typing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates from central European countries**, *Acta Virol.*, 57. 363–368, 2013.
- Jenkins, G.M., Rambaut, A., Pybus, O.G., Holmes, E.C.: **Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis**, *J. Mol. Evol.*, 54. 156–165, 2002.

- Karniychuk, U.U., Nauwynck, H.J.: **Pathogenesis and prevention of placental and transplacental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection**, *Vet. Res.*, 44. 95, 2013.
- Kim, H.S., Kwang, J., Yoon, I.J., Joo, H.S., Frey, M.L.: **Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line**, *Arch. Virol.*, 133. 477-483, 1993.
- Kim, D.G., Song, C.S., Choi, I.S., Park, S.Y., Lee, J.B., Lee, S.S.: **The signal sequence of type II porcine reproductive and respiratory syndrome virus glycoprotein 3 is sufficient for endoplasmic reticulum retention**, *J. Vet. Sci.*, 14. 307–313, 2013
- Kimura, M.: **A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences**, *J. Mol. Evol.*, 16. 111–120, 1980.
- Kiraga, J., Mackiewicz, P., Mackiewicz, D., Kowalczyk, M., Biecek, P., Polak, N., Smolarczyk, K., Dudek, M.R., Cebrat, S.: **The relationships between the isoelectric point and: length of proteins, taxonomy and ecology of organisms**, *BMC Genomics*, 8. 163, 2007.
- Keffaber, K.K.: **Reproductive failure of unknown etiology**, *Am. Assoc. Swine Prac. News*, 1. 1, 1989.
- Kristensen, C.S.: **PRRSV control in Denmark: Status and perspectives**. EuroPRRS2012, Lecture conducted from Pig Research Centre, Danish Agriculture & Food Council Denmark. 2012.
- Kvisgaard, L.K., Hjulsager, C.K., Brar, M.S., Leung, F.C., Larsen, L.E.: **Genetic dissection of complete genomes of Type 2 PRRS viruses isolated in Denmark over a period of 15 years**, *Vet. Microbiol.*, 167. 334–344, 2013.
- Kwon, B., Ansari, I.H., Pattnaik, A.K., Osorio, F.A.: **Identification of virulence determinants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus through construction of chimeric clones**, *Virology*, 380. 371-378, 2008.
- Ladinig, A., Ashley, C., Detmer, S.E., Wilkinson, J.M., Lunney, J.K., Plastow G., Harding, J.C.S.: **Maternal and fetal predictors of fetal viral load and death in third**

**trimester, type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus infected pregnant gilts**, *Vet. Res.*, 46. 107, 2015a.

Ladinig, A., Detmer, S.E., Clarke, K., Ashley, C., Rowland, R.R., Lunney, J.K., Harding, J.C.: **Pathogenicity of three type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains in experimentally inoculated pregnant gilts**, *Virus Res.*, 203. 24-35, 2015b.

Lemke, C.D., Haynes, J.S., Spaete, R., Adolphson, D., Vorwald, A., Lager, K., Butler, J.: **Lymphoid hyperplasia resulting in immune dysregulation is caused by porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in neonatal pigs**. *J. Immunol.*, 172. 1916-1925, 2004.

Li, Y., Zhou, L., Zhang, J., Ge, X., Zhou, R., Zheng, H., Geng, G., Guo, X., Yang, H.: **Nsp9 and Nsp10 contribute to the fatal virulence of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerging in China**, *PLoS Pathog.*, 10. e1004216, 2014.

Lima, D.M., Pattnaik, A.K., Flores, E.F., Osorio, F.A.: **Serologic marker candidates identified among B-cell linear epitopes of nsp2 and structural proteins of a North American strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus**, *Virology*, 353. 410–421, 2006.

Lole, K.S., Bollinger, R.C., Paranjape, R.S., Gadkari, D., Kulkarni, S.S., Novak, N.G., Ingersoll, R., Sheppard, H.W., Ray, S.C.: **Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination**, *J. Virol.*, 73. 152–160, 1999.

Loula, T.: **Mystery pig disease**, *Agri. Prac.*, 12. 23-34, 1991.

Lunney, J.K., Fang, Y., Ladinig, A., Chen, N., Li, Y., Rowland, B., Renukaradhya, G.J.: **Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV): Pathogenesis and interaction with the immune system**, *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, 4. 129-154, 2016.

Magyar, T., Lax, A.J.: **Atrophic rhinitis**. In: **Polymicrobial Diseases**. Eds: K. A. Brogden and J. M. Guthmiller. ASM Press, Washington DC. 169-197, 2002.

Mameli, G., Cossu, D., Cocco, E., Masala, S., Frau, J., Marrosu, M.G., Sechi, L.A.: **Epstein-Barr virus and Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis**

- peptides are cross recognized by anti-myelin basic protein antibodies in multiple sclerosis patients**, *J. Neuroimmunol.*, 270. 51-55, 2014.
- Marle, V.G., Dobbe, J.C., Gulyaev, A.P., Luytjes, W., Spaan, W.J., Snijder, E.J.: **Arterivirus discontinuous mRNA transcription is guided by base pairing between sense and antisense transcription-regulating sequences**, *PNAS*, 96. 12056-12061, 1999.
- Martín-Valls, G.E., Kvisgaard, L.K., Tello, M., Darwich, L., Cortey, M., Burgara-Estrella, A.J., Hernández, J., Larsen, L.E., Mateu, E.: **Analysis of ORF5 and full-length genome sequences of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates of genotypes 1 and 2 retrieved worldwide provides evidence that recombination is a common phenomenon and may produce mosaic isolates**, *J. Virol.*, 88. 3170-3181, 2014.
- Martínez-Lobo, F.J., Díez-Fuertes, F., Segalés, J., García-Artiga, C., Simarro, I., Castro, J.M., Prieto, C.: **Comparative pathogenicity of type 1 and type 2 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in a young pig infection model**, *Vet. Microbiol.*, 154. 58–68, 2011.
- Marqués, G., Antón, L.C., Barrio, E., Sánchez, A., Ruiz, S., Gavilanes, F., Vivanco, F.: **Arginine residues of the globular regions of human C1q involved in the interaction with immunoglobulin G**, *J. Biol. Chem.*, 268. 10393-103402, 1993.
- Mateu, E., Diaz, I.: **The challenge of PRRS immunology**, *Vet. J.*, 177. 345–351, 2008.
- Meier, C., Aricescu, A.R., Assenberg, R., Aplin, R.T., Gilbert, R.J., Grimes, J.M., Stuart, D.I.: **The crystal structure of ORF-9b, a lipid binding protein from the SARS coronavirus**, *Structure*, 14. 1157-1165, 2006.
- Meulenbergh, J.J.M.: **PRRSV, the virus**, *Vet. Res.*, 31. 11-21, 2000.
- Meulenbergh, J.J., van Nieuwstadt, A.P., Essen-Zandbergen, V.A., Langeveld, J.P.: **Posttranslational processing and identification of a neutralization domain of the GP4 protein encoded by ORF4 of the Lelystad Virus**, *J. Virol.*, 71. 6061–6070, 1997.
- Mokhtar, H., Eck, M., Morgan, S.B., Essler, S.E., Frossard, J.P., Ruggli, N., Graham, S.P.: **Proteome-wide screening of the European porcine reproductive and**

- respiratory syndrome virus reveals a broad range of T cell antigen reactivity**, *Vaccine*, 32. 6828-6837, 2014.
- Mold, C., Gresham, H.D., Du Clos, T.W.: **Serum amyloid P component and C-reactive protein mediate phagocytosis through murine Fc gamma Rs**, *J. Immunol.*, 166. 1200-1205, 2001.
- Murtaugh, M.P., Stadejek, T., Abrahante, J.E., Lam, T.T., Leung, F.C.: **The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus**, *Virus Res.*, 154. 18–30, 2010.
- Nauwynck, H., Frydas, I., Christiaens, I., Breedam, V.W., Bonckaert, C., Trus, C.: **Changing receptor use of PRRSV leads to different virological, immunological and clinical outcome impact on diagnosis and control**, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, 2014.
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B, Jr.: **GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments**, Distributed by the author, 1997.
- Nieuwenhuis, N., Duinhof, T.F., Nes, V.A.: **Economic analysis of outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in nine sow herds**, *Vet. Rec.*, 170. 225, 2012.
- Novakovic, P., Harding, J.C., Al-Dissi, A.N., Ladinig, A., Detmer, S.E.: **Pathologic evaluation of type 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus infection at the maternal-fetal interface of late gestation pregnant gilts**, *PLoS One*, 11. e0151198, 2016.
- Oh, J., Lee, C.: **Proteomic characterization of a novel structural protein ORF5a of porcine reproductive and respiratory syndrome virus**, *Virus Res.*, 169. 255-263, 2012.
- Oleksiewicz, M.B., Bøtner, A., Normann, P.: **Porcine B-cells recognize epitopes that are conserved between the structural proteins of American- and European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus**, *J. Gen. Virol.*, 83. 1407–1418, 2002.
- Oleksiewicz, M.B., Bøtner, A., Toft, P., Grubbe, T., Nielsen, J., Kamstrup, S., Storgaard, T.: **Emergence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus deletion mutants: correlation with the porcine antibody response to a**

- hypervariable site in the ORF 3 structural glycoprotein**, *Virology*, 267. 135–140, 2000.
- Ornstein, L., Davis, B.J.: **Disc electrophoresis-I: Background and theory**, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121. 321–349, 1964.
- Ostrowski, M., Galeota, J.A., Jar, A.M., Platt, K.B., Osorio, F.A., Lopez, O.J.: **Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain**, *J. Virol.*, 76. 4241–4250, 2002.
- Pallarés, F.J., Halbur, P.G., Opriessnig, T., Sorden, S.D., Villar, D., Janke, B.H., Yaeger, M.J., Larson, D.J., Schwartz, K.J., Yoon, K.J., Hoffman, L.J.: **Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)**, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 14. 515–519, 2002.
- Papworth, C., Bauer, J.C., Braman, J., Wright, D.A.: **Site-directed mutagenesis in one day with >80 % efficiency**, *Strategies*, 9. 3–4, 1996.
- Park, S.H., Raines, R.T.: **Fluorescence gel retardation assay to detect protein-protein interactions**, *Methods Mol. Biol.*, 261. 155-160, 2004.
- Plagemann, P.G.W., Rowland, R.R.R., Faaberg, K.S.: **The primary neutralization epitope of porcine respiratory and reproductive syndrome virus strain VR2332 is located in the middle of the GP5 ectodomain**, *Arch. Virol.*, 147. 2327–2347, 2002.
- Prieto, C., Vázquez, A., Núñez, J.I., Alvarez, E., Simarro, I., Castro, J.M.: **Influence of time on the genetic heterogeneity of Spanish porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates**, *Vet. J.*, 180. 363–370, 2009.
- Posthuma, C.C., Pedersen, K.W., Lu, Z., Joosten, R.G., Roos, N., Zevenhoven-Dobbe, J.C., Snijder, E.J.: **Formation of the arterivirus replication/transcription complex: a keyrole for nonstructural protein 3 in the remodeling of intracellular membranes**, *J. Virol.*, 82. 4480-4491, 2008.
- Quarantino, S., Thorpe, C.J., Travers, P.J., Londei, M.: **Similar antigenic surfaces, rather than sequence homology, dictate T-cell epitope molecular mimicry**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92. 10398-10402, 1995.



- Rascón-Castelo, E., Burgara-Estrella, A., Mateu, E., Hernández, J.: **Immunological features of the non-structural proteins of porcine reproductive and eespiratory syndrome virus**, *Viruses*, 7. 873–886, 2015.
- Robinson, S.R., Abrahante, J.E., Johnson, C.R., Murtaugh, M.P.: **Purifying selection in porcine reproductive and respiratory syndrome virus ORF5a protein influences variation in envelope glycoprotein 5 glycosylation**, *Infect. Genet. Evol.*, 20. 362–368, 2013.
- Routsias, J.G., Tzioufas, A.G.: **B-cell epitopes of the intracellular autoantigens Ro/SSA and La/SSB: tools to study the regulation of the autoimmune response**, *J. Autoimmun.*, 35. 256-264, 2010.
- Rowland, R.R., Lawson, S., Rossow, K., Benfield, D.A.: **Lymphoid tissue tropism of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication during persistent infection of pigs originally exposed to virus in utero**, *Vet. Microbiol.*, 96. 219–235, 2003.
- Saitou, N., Nei, M.: **The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees**. *Mol. Biol. Evol.*, 4. 406-425, 1987.
- Samrat, S.K., Li, W., Singh, S., Kumar, R., Agrawal, B.: **Alternate reading frame protein (F protein) of hepatitis C virus: paradoxical effects of activation and apoptosis on human dendritic cells lead to stimulation of T cells**, *PLoS One*, 9. e86567, 2014.
- Schneider, S., Zacharias, M.: **Atomic resolution model of the antibody Fc interaction with the complement C1q component**, *Mol. Immunol.*, 51. 66-72, 2012.
- Schwartz, R., Ting, C.S., King, J.: **Whole proteome pI values correlate with subcellular localizations of proteins for organisms within the three domains of life**, *Genome Res.*, 11. 703-709, 2001.
- Scotti, M., Prieto, C., Alvarez, E., Simarro, I., Castro, J.M.: **Failure of an inactivated vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome to protect gilts against a heterologous challenge with PRRSV**, *Vet. Rec.*, 161. 809-813, 2007.
- Senanayake, S.D., Brian, D.A.: **Bovine coronavirus I protein synthesis follows ribosomal scanning on the bicistronic N mRNA**, *Virus Res.*, 48. 101-105, 1997.

- Shi, C.S., Qi, H.Y., Boullaran, C., Huang, N.N., Abu-Asab, M., Shelhamer, J.H., Kehrl, J.H.: **SARS-coronavirus open reading frame-9b suppresses innate immunity by targeting mitochondria and the MAVS/TRAF3/TRAF6 signalosome**, *J. Immunol.*, 193. 3080-3089, 2014.
- Shi, M., Lam, T.T., Hon, C.C., Hui, R.K., Faaberg, K.S., Wennblom, T., Murtaugh, M.P., Stadejek, T., Leung, F.C.: **Molecular epidemiology of PRRSV: A phylogenetic perspective**, *Virus Res.*, 154. 7–17, 2010a.
- Shi, M., Lam, T.T., Hon, C.C., Murtaugh, M.P., Davies, P.R., Hui, R.K., Li, J., Wong, L.T., Yip, C.W., Jiang, J.W., Leung, F.C.: **Phylogeny-based evolutionary, demographical, and geographical dissection of North American type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses**, *J. Virol.*, 84. 8700–8711, 2010b.
- Snijder, E.J., Meulenbergh, J.J.M.: **The molecular biology of arteriviruses**, *J. Gen. Virol.*, 79. 961-979, 1998.
- Song, J., Shen, D., Cui, J., Zhao, B.: **Accelerated evolution of PRRSV during recent outbreaks in China**, *Virus Genes*, 41. 241–245, 2010.
- Sospedra, M., Zhao, Y., zur Hausen, H., Muraro, P.A., Hamashin, C., de Villiers, E.M., Pinilla, C., Martin, R.: **Recognition of conserved amino acid motifs of common viruses and its role in autoimmunity**, *PLoS Pathog.*, 1. e41, 2005.
- Stadejek, T., Oleksiewicz, M.B., Potapchuk, D., Podgórska, K.: **Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in eastern Europe support the definition of new genetic subtypes**, *J. Gen. Virol.*, 87. 1835–1841, 2006.
- Stoyanova, V., Tchorbadjieva, M., Deliyska, B., Vasilev, V., Tsacheva, I.: **Biochemical analysis of the epitope specificities of anti-C1q autoantibodies accompanying human lupus nephritis reveals them as a dynamic population in the course of the disease**, *Immunol. Lett.*, 148. 69-76, 2012.
- Sun, Z., Chen, Z., Lawson, S.R., Fang, Y.: **The cysteine protease domain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 2 possesses deubiquitinating and Interferon antagonism functions**, *J. Virol.*, 84. 7832–7846, 2010.

- Szeredi, L., Dán, Á., Solymosi, N., Cságola, A., Tuboly, T.: **Association of porcine circovirus type 2 with vascular lesions in porcine pneumonia**, *Vet. Pathol.*, 49. 264-270, 2012.
- Szabó, I., Abonyi, T., Molnár, T., Nemes, I.: **PRRS Mentésítés Magyarország**, UBM Cégcsoport, Sertéstartás és-tenyésztés konferencia. [www.ubm.hu/wp-content/uploads/2014/10/PRRS\\_mentesites\\_szabo\\_istvan.pdf](http://www.ubm.hu/wp-content/uploads/2014/10/PRRS_mentesites_szabo_istvan.pdf), 2014.
- Tamura, K., Nei, M.: **Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees**, *Mol. Biol. Evol.*, 10. 512–526, 1993.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S.: **MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods**, *Mol. Biol. Evol.*, 28. 2731–2739, 2011.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., Kumar, S.: **MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0**, *Mol. Biol. Evol.*, 30. 2725–2729, 2013.
- Tatusov, T., Tatusov, R.: **ORF Finder. NCBI website.**, 2011.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>
- Terpstra, C., Wensvoort, G., Pol, J.M.: **Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus: Koch's postulates fulfilled**, *Vet. Q.*, 13. 131-136, 1991.
- Thaa, B., Sinhadri, B.C., Tievesch, C., Krause, E., Veit, M.: **Signal peptide cleavage from GP5 of PRRSV: a minor fraction of molecules retains the decoy epitope, a presumed molecular cause for viral persistence**, *PLoS One*, 8. e65548, 2013.
- Thacker, E.L., Halbur, P.G., Ross, R.F., Thanawongnuwech, R., Thacker, B.J.: **Mycoplasma hyopneumoniae potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia**, *J. Clin. Microbiol.*, 37. 620–627, 1999.
- Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Tatsanakit, A., Damrongwatanapokin, S.: **Genetics and geographical variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand**, *Vet. Microbiol.*, 101. 9–21, 2004.

- Tian, K., Yu, X., Zhao, T., Feng, Y., Cao, Z., Wang, C., Hu, Y., Chen, X., Hu, D., Tian, X., Liu, D., Zhang, S., Deng, X., Ding, Y., Yang, L., Zhang, Y., Xiao, H., Qiao, M., Wang, B., Hou, L., Wang, X., Yang, X., Kang, L., Sun, M., Jin, P., Wang, S., Kitamura, Y., Yan, J., Gao, G.F.: **Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark**, PLoS ONE, 2. e526, 2007.
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., Leunissen, J.A.: **Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3**, Nucleic Acids Res., 35. W71–74, 2007.
- Vanhee, M.W., Breedam, V.W., Costers, S., Geldhof, M., Noppe, Y., Nauwynck, H.: **Characterization of antigenic regions in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus by the use of peptide-specific serum antibodies**, Vaccine, 29. 4794–4804, 2011.
- Vashisht, K., Goldberg, T.L., Husmann, R.J., Schnitzlein, W., Zuckermann, F.A.: **Identification of immunodominant T-cell epitopes present in glycoprotein 5 of the North American genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus**, Vaccine, 26. 4747–5753, 2008.
- Vaughan, J.H., Valbracht, J.R., Nguyen, M.D., Handley, H.H., Smith, R.S., Patrick, K., Rhodes, G.H.: **Epstein-Barr virus-induced autoimmune responses. I. Immunoglobulin M autoantibodies to proteins mimicking and not mimicking Epstein-Barr virus nuclear antigen-1**, J. Clin. Invest., 95. 1306-1315, 1995.
- Vitagliano, L., Fiume, G., Scognamiglio, P.L., Doti, N., Cannavò, R., Puca, A., Pedone, C., Scala, G., Quinto, I., Marasco, D.: **Structural and functional insights into I $\kappa$ B- $\alpha$ /HIV-1 Tat interaction**, Biochimie., 93. 1592-1600, 2011.
- Wang, X., Dang, R., Liu, W., Yang, Z., Du, E., Zhang, S.: **Antigenic characteristics of glycosylated protein 3 of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus**, Virus Res., 189. 24–28, 2014.
- Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J.M., ter Laak, E.A., Bloemraad, M., de Kluyver, E.P., Kragten, C., van Buiten, L., den Besten, A., Wagenaar, F., et al.: **Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus**, Vet. Q., 13. 121-130, 1991.

- Wills, R.W., Zimmerman, J.J., Yoon, K.J., Swenson, S.L., McGinley, M.J., Hill, H.T., Platt, K.B., Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A.: **Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection**, *Vet. Microbiol.*, 55. 231-240, 1997.
- Wissink, E.H., van Wijk, H.A., Kroese, M.V., Weiland, E., Meulenbergh, J.J., Rottier, P.J., van Rijn, P.A.: **The major envelope protein, GP5, of a European porcine reproductive and respiratory syndrome virus contains a neutralization epitope in its N-terminal ectodomain**, *J. Gen. Virol.*, 84. 1535–1543, 2003.
- Whitworth, K.M., Rowland, R.R., Ewen, C.L., Tribble, B.R., Kerrigan, M.A., Cino-Ozuna, A.G., Samuel, M.S., Lightner, J.E., McLaren, D.G., Mileham, A.J., Wells, K.D., Prather, R.S.: **Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus**, *Nat. Biotechnol.*, 34. 20-22, 2016
- Wu, W.H., Fang, Y., Farwell, R., Steffen-Bien, M., Rowland, R.R.R., Christopher-Hennings, J., Nelson E.A.: **10-kDa Structural Protein of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Encoded by ORF2b**, *Virology*, 287. 183-191, 2001.
- Wucherpfennig, K.W., Strominger, J.L.: **Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein**, *Cell*, 80. 695-705, 1995.
- Xu, X., Yu, X., Deng, X., Yue, M., Zhang, J., Zhu, D., Zhou, Z., Zhai, X., Xu, K., Zhang, Y.: **Hepatitis C virus alternate reading frame protein decreases interferon- $\alpha$  secretion in peripheral blood mononuclear cells**, *Mol. Med. Rep.*, 9. 730-736, 2014.
- Yan, Y., Guo, X., Ge, X., Chen, Y., Cha, Z., Yang, H.: **Monoclonal antibody and porcine antisera recognized B-cell epitopes of Nsp2 protein of a Chinese strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus**, *Virus Res.*, 126. 207–215, 2007.
- You, J.H., Howell, G., Pattnaik, A.K., Osorio, F.A., Hiscox, J.A.: **A model for the dynamic nuclear/nucleolar/cytoplasmic trafficking of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) nucleocapsid protein based on live cell imaging**, *Virology*, 378. 34-47, 2008.

- Zádori, Z., Szelei, J., Lacoste, M.C., Li, Y., Gariépy, S., Raymond, P., Allaire, M., Nabi, I.R., Tijssen, P.: **A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity**, *Dev. Cell.*, 1. 291–302, 2001.
- Zádori, Z., Szelei, J., Tijssen, P.: **SAT: a late NS protein of porcine parvovirus**, *J. Virol.*, 79. 13129-13138, 2005.
- Zhou, Y.J., An, T.Q., He, Y.X., Liu, J.X., Qiu, H.J., Wang, Y.F., Tong, G.: **Antigenic structure analysis of glycosylated protein 3 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus**, *Virus Res.*, 118. 98–104, 2006.
- Zhou, Y.J., Yua, H., Tian, Z.J., Liu, J.X., An, T.Q., Peng, J.M., Li, G.-X., Jiang, Y.F., Cai, X.H., Xue, Q., Wang, M., Wang, Y.F., Tong, G.Z.: **Monoclonal antibodies and conserved antigenic epitopes in the C terminus of GP5 protein of the North American type porcine reproductive and respiratory syndrome virus**, *Vet. Microbiol.*, 138. 1–10, 2009.
- Zimmerman, J.J.: **Historical overview of PRRS virus**, *PRRS compendium*, Chapter 1. 2003.
- Zuckermann, F.A., Garcia, E.A, Luque, I.D., Christopher-Hennings, J., Doster, A., Brito, M., Osorio, F.: **Assessment of the efficacy of commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccines based on measurement of serologic response, frequency of gamma-IFN-producing cells and virological parameters of protection upon challenge**, *Vet. Microbiol.*, 123. 69-85, 2007.

## 10. A doktori kutatás eredményeiből született közlemények

### 10.1 Lektorált tudományos folyóiratban megjelent publikációk

Bálint Á, Balka G, Horváth P, Kecskeméti S, Dán Á, Farsang A, Szeredi L, Bányai K, Bartha D, Olasz F, Belák S, Zádori Z.: **Full-length genome sequence analysis of a Hungarian porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolated from a pig with severe respiratory disease**, Arch. Virol., 160. 417-422, 2015.

I.F: 2,058

Balka G., Wang, X., Olasz F., Bálint Á., Kiss I., Bányai K., Rusvai M., Stadejek, T., Marthaler, D., Murtaugh, M.P., Zádori Z.: **Full genome sequence analysis of a wild, non-MLV-related type 2 Hungarian PRRSV variant isolated in Europe**, Virus Res., 200. 1-8, 2015.

I.F: 2,628

Olasz F, Dénes B, Bálint Á, Magyar T, Belák S, Zádori Z.: **Immunological and biochemical characterisation of 7ap, a short protein translated from an alternative frame of ORF7 of PRRSV**, Acta Vet. Hung., 64. 273-287, 2016.

I.F: 0,871

Olasz F, Dénes B, Bálint Á, Magyar T, Belák S, Zádori Z.: **Characterisation of the nucleic acid binding features of the PRRSV 7ap and its ability to induce antinuclear antibodies**, Acta Vet. Hung., 65. 124-134, 2017.

I.F: 0,871

Olasz F., Bálint Á., Balka G., Kádár-Hürkecz E., Zádori Z.: **A sertés reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómája (PRRS) és a betegséget okozó vírus biológiája**, Magy. Állatorv. Lapja, 138. 523-540, 2016.

I.F: 0,212

### 10.2 A doktori kutatás témájához szorosan nem kapcsolódó publikációk

Mészáros I, Tóth R, Olasz F, Tijssen P, Zádori Z.: **The SAT protein of porcine parvovirus accelerates viral spreading through irreversible ER stress induction**, J. Virol., doi:10.1128/JVI.00627-17, 2017.

I.F: 4,606

Olasz F., Kádár-Hürkecz E., Bálint Á., Lakatos B., Zádori Z.: **A macskák fertőző hashártyagyulladás (FIP) és az azt okozó vírus biológiája. Irodalmi összefoglaló**, Magy. Állatorv. Lapja, 139. 523-540, 2017.

I.F: 0,212

## 11. Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Zádori Zoltánnak a lehetőséget, hogy doktori tanulmányaimat a témacsoportjában végezhettem a PRRSV témában. Köszönöm az Funkcionális Virologia témacsoport minden jelenlegi és volt tagjának, Mészáros Istvánnak, Tóth Renátának és Horváth Péternek a sok elméleti és gyakorlati segítséget.

Köszönettel tartozom Dr. Balka Gyulának (Állatorvostudományi Egyetem, Patológiai Tanszék) és Dr. Kecskeméti Sándornak (NÉBIH ÁDI Debrecen), hogy rendelkezésünkre bocsájtották a megfelelő mintákat, valamint Dr. Hornyák Ákosnak és Dr. Bálint Ádámnak (NÉBIH ÁDI Budapest), hogy rendelkezésünkre bocsájtották a szövetmintákból izolált vírusokat.

Hálásan köszönöm Dr. Bányai Krisztiánnak (MTA ATK ÁOTI, Új kórokozók felderítése témacsoport) és munkatársainak, Forró Barbarának és Marton Szilviának az izolátumok szekvenálásában végzett munkát, és a szekvenciák összeillesztésében nyújtott segítségüket.

Köszönet illeti Dr. Dénes Bélát (NÉBIH ÁDI Budapest) és munkatársait, hogy segítettek összeállítani a komplementkötés gátlási tesztet, és rendelkezésemre bocsájtották az ehhez szükséges eszközöket és anyagokat.

Külön köszönettel tartozom Dr. Farkas Szilviának és Mészáros Istvánnak dolgozatom gondos átolvasásáért és hasznos tanácsaikért.

A munka anyagi háttérét az OTKA-K108607 számú pályázata biztosította.



## 12. Függelék

### 12.1 ORF7a megőrzöttségének vizsgálatához felhasznált szekvenciák génbanki azonosító számai

<b>Törzs neve</b>	<b>Génbanki azonosító szám</b>	<b>Törzs neve</b>	<b>Génbanki azonosító szám</b>
<b>HKEU-16</b>	EU076704	<b>Sno-6</b>	DQ324714
<b>KNU-07</b>	FJ349261	<b>Aus</b>	AF438362
<b>Lelystad</b>	M96262	<b>Vas-3</b>	DQ324723
<b>HU-14432/2011</b>	KR296711	<b>Upa-13</b>	DQ324721
<b>01CB1</b>	DQ864705	<b>WUH4</b>	JQ326271
<b>Amervac</b>	GU067771	<b>NVD-JS2-2011</b>	JQ715698
<b>SHE</b>	GQ461593	<b>Ch-1a</b>	AY032626
<b>Psyrsvac-187</b>	DQ324712	<b>P129</b>	AF494042
<b>BJEU061</b>	GU047344	<b>JA-142</b>	AF396842
<b>IV3140</b>	DQ355822	<b>VR-2332</b>	U87392.3
<b>07v063</b>	GU737264	<b>Yn-2011</b>	JX857698
<b>Dzi-64</b>	DQ324706	<b>CA</b>	FJ194950
<b>Che-64</b>	DQ324703	<b>A2CM2</b>	JQ087873
<b>Lena</b>	JF802085	<b>MN3010</b>	EF536000
<b>Zad-39</b>	DQ324733	<b>97-7985</b>	AF325691
<b>Obu-1</b>	DQ324707	<b>SDSU73</b>	EF442775
<b>Yuz-48</b>	DQ324728	<b>17198-6</b>	EF442776
<b>Zap-41</b>	DQ324734	<b>Hawkeye</b>	EF532815
<b>Vos-29</b>	DQ324725	<b>Flagship</b>	EF532804
<b>Soz-8</b>	DQ324720	<b>MN184B</b>	DQ176020
<b>NMEU09-1</b>	GU047345	<b>05K212</b>	EF441810

## 12.2 9625/2012 filogenetikai vizsgálatához felhasznált szekvenciák génbanki azonosító számai

<b>Törzs neve</b>	<b>Génbanki azonosítószám</b>	<b>Törzs neve</b>	<b>Génbanki azonosító szám</b>
<b>EuroPRRSV</b>	AY3666525	<b>03RB1</b>	AY297124
<b>Lelystad</b>	M96262	<b>361-4</b>	AY035915
<b>Porcilis</b>	AF378819	<b>2029/1997</b>	AY035930
<b>2231</b>	AY875859	<b>IT-39</b>	AY739995
<b>2906-2</b>	AY875862	<b>2567/1996</b>	AY035932
<b>65/2/1991</b>	AY035936	<b>IT-13</b>	AY739969
<b>Stendal V953</b>	JN651728	<b>Bel-24</b>	DQ324669
<b>Olot/1991</b>	KF203132	<b>Lena</b>	JF802085
<b>AmerVac</b>	DQ324668	<b>Okt-35</b>	DQ324677
<b>HU36</b>	EF406351	<b>Aus</b>	AF438362
<b>28639/1998</b>	AY035912	<b>Sid</b>	DQ324682
<b>32-10/1992</b>	AY035913	<b>VR-2332</b>	U87392.3

**12.3 PRRSV-2/Hungary/102/2012 filogenetikai vizsgálatához felhasznált szekvenciák génbanki azonosító számai**

Törzs neve	Génbanki azonosító szám	Törzs neve	Génbanki azonosítószám	Törzs neve	Génbanki azonosító szám
PRRSV-2/Hungary/102/2012	KM514315	PRRSV2/India na/XW083/2010	KP283449	PA8	AF176348
GD-2011	KC527830	PRRSV2/India na/XW092/2013	KP283458	MLV ResPRRS	AF159149
10-10QN	JQ663556	NC16845	HQ699067	PRRSV2/Indiana/XW096/2011	KP300940
JX	JX317649	2000-5424	EU556160	PRRSV2/Indiana/XW086/2011/ORF5	KP283452
10-LW8-1	JQ663568	17198-6	AY656989	FJ-1	AY881994
09HEB	JF268679	MN30100	EF536000	QY2010	JQ743666
07QN	JF268673	PRRSV2/India na/XW082/2008	KP283448	SH1211	KF678434
09HUN1	GU168567	PRRSV2/India na/XW068/2008	KP283434	02-01676	DQ480117
JXA1	EF112445	XW0012	KF724405	AY641474	AY641474
NVDC-JS2-2011	JQ715698	XW0014	KF724406	PRRSV2/Indiana/XW088/2007	KP283454
SRV07	JX512910	XW007	KF724403	PRRSV2/Indiana/XW093/2013	KP283459
NVDC-GD2-2011	JQ715697	AF066384	AF066384	PRRSV2/Indiana/XW078/2013	KP283444
HK4	KF287134	Neb-1	EU755263	PRRSV2/Indiana/XW066/2008	KP283432
HB-1	AY150312	XW0019	KF724407	FF4 After	EF532809
GD3	GU269541	NADC-8	AF396835	PRRSV2/Indiana/XW063/2007	KP283430
SHB	EU864232	LMY	DQ473474	98-3298	DQ306877
Em2007/	EU262603	ISU-P	EF532816	02SP3	AY297118
CH-1a	AY032626	PRRSV01	AF176424	PRRSV2/Indiana/XW056/2012	KP283423
PRRSV2/Indiana/XW050/2013/	KP283417	HZ-31	KC445138	PRRSV2/Indiana/XW089/2011	KP283455

QUAL2 After	EF536002	NADC30	JN654459	DK-2004-2-1	KC862585
<b>Törzs neve</b>	<b>Génbanki azonosító szám</b>	<b>Törzs neve</b>	<b>Génbanki azonosító szám</b>	<b>Törzs neve</b>	<b>Génbanki azonosító szám</b>
SDSU-73	JN654458	PRRSV2/India na/XW062/200 6	KP283429	PRRSV2/Ind iana/XW081/ 2013	KP283447
XW008	KF724404	DK-2010-10-4- 1	KC862583	AB175710	AB175710
JA142/ 	AY424271	PRRSV2/Mich igan/XW094/2 006	KP283460	PRRSV2/Ind iana/XW054/ 2012/ORF5	KP283421
NADC 20	JX069953	PRRSV2/India na/XW052/201 2	KP283419	PRRSV2/Ind iana/XW084/ 2011	KP283450
98-6470-1	AF339493	Hawkeye4 After	EF532812	PRRSV2/Ind iana/XW076/ 2012	KP283442
PRRSV2/Ind iana/XW080/ 2013	KP283446	Hawkeye7 Before	EF532815	PRRSV0045 64_Kanada	DQ494260
2000-52502	EU556180	MN184A	DQ176019	K05-0050 Del-Korea	JQ656133
PRRSV2/Ind iana/XW055/ 2012/ORF5	KP283422	Biss After	EF532802	PRRSV0045 66_Kanada_ 2002	DQ494262
PRRSV2/Illi nois/XW051/ 2011	KP283418	Lewis After	EF532817	PRRSV0091 4_USA_MN _2001	DQ475481
PRRSV2/Ind iana/XW072/ 2011	KP283438	CA-2	KF555450	PRRSV0065 5_USA_MN _2000	DQ475274
PRRSV2/Ind iana/XW067/ 2008	KP283433	PRRSV2/India na/XW070/200 9	KP283436	PRRSV0002 017_USA_M N_2003	DQ476341
PRRSV2/Ind iana/XW059/ 2006/ORF5	KP283426	PRRSV2/India na/XW069/200 9	KP283435	PRRSV0098 8_USA_MN _2001	DQ475539
PRRSV2/Mi nnesota/XW 095/2007/O RF5	KP283461	PRRSV2/Mich igan/XW090/2 011	KP283456	IAF 93- 2616_Kanad a 1993	U64932
PRRSV2/Ind iana/XW061/ 2006	KP283428	Minnesota3	KP283412	PRRSV0072 07_USA_IA _2004	EU757719
98-31701-1	AF339494	XW003	KF724401	PRRSV0015 56_USA_M N_2002	DQ476003
Minnesota- 11A	KP283407	XW009	KF724402	IAF 94-287	U64934
Minnesota1 5	KP283405	Minnesota4	KP283411	PRRSV2000 247_USA_N C_2007	EU759413
JA1262	KF724400	Minnesota7	KP283409	PRRSV0035	DQ477597

				<b>50_USA_M O_1999</b>	
<b>HENAN-HEB</b>	KJ143621	<b>Minnesota5</b>	KP283410	<b>Hawkeye2 Before</b>	EF532811
<b>Törzs neve</b>	<b>Génbanki azonosító szám</b>	<b>Törzs neve</b>	<b>Génbanki azonosító szám</b>	<b>Törzs neve</b>	<b>Génbanki azonosító szám</b>
<b>Minnesota9</b>	KP283408	<b>XW001</b>	KF632717	<b>PRRSV2/Ind iana/XW053/ 2012</b>	KP283420
<b>PRRSV2/Ind iana/XW060/ 2006/ORF5</b>	KP283427	<b>Minnesota16</b>	KP283404	<b>PRRSV2/Ind iana/XW085/ 2011</b>	KP283451
<b>PRRSV2/Ind iana/XW064/ 2007/ORF5</b>	KP283431	<b>PRRSV2/India na/XW071/201 0</b>	KP283437	<b>PRRSV2/Ind iana/XW075/ 2011</b>	KP283441
<b>PRRSV2/Ind iana/XW065/ 2007/ORF5</b>	KP283431	<b>PRRSV2/Illino is/XW073/201 1</b>	KP283439	<b>Minnesota1</b>	KP283414
<b>Hawkeye4 Before</b>	EF532813	<b>PRRSV2/Mich igan/XW074/2 011</b>	KP283440	<b>PRRSV2/Ind iana/XW087/ 2013</b>	KP283453
<b>Ingelvac ATP</b>	DQ988080	<b>PRRSV2/India na/XW079/201 3/ORF5</b>	KP283445		